



PAPEL DE LOS RECEPTORES DE KAINATO EN LA MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN EL CEREBELO

**Memoria presentada por D^a. Pilar Losada Ruiz
para optar al grado de doctora**

Director: Dr. D. Antonio Rodríguez Moreno

Noviembre de 2020

Agradecimientos:

A mi tutor y director, Dr. D. Antonio Rodríguez Moreno, por haber depositado en mí la confianza y la motivación para sacar adelante esta tesis doctoral, a pesar de las dificultades.

A mis padres, Reyes y José Manuel, por hacerme sentir que sigo en casa aunque esté lejos, por protegerme y apoyarme en cada decisión, por enseñarme que la verdadera felicidad está en pequeños momentos como compartir una copa de vino, una tortilla de patatas recién hecha, y un ataque de risa incontrolable.

A mi hermana María, mi refugio para los buenos y los malos momentos. Gracias por ponerme los pies en el suelo y darme alas para volar a partes iguales. Por conocerme mejor que yo misma. Por esas largas charlas telefónicas que llenan de energía y acaban en planes para ir a nuevos conciertos. ¡Iguales!

A Félix, mi “amigo increíble” y compañero de vida, mi constante apoyo y consejero particular. Por compartir conmigo su entusiasmo por la vida y por darme siempre el empujoncito necesario para hacer lo que me proponga.

A mis compañeros de laboratorio en general, y en particular:

A Rafa, por pasar de ser un compañero que no saluda a un gran amigo. Por estar siempre dispuesto a ayudarme y apoyarme, por transmitirme la ilusión por la ciencia y las ganas de trabajar, por ser un ejemplo de lucha. También por las discusiones que acaban en carcajadas, por las preguntas extrañas y por las tardes y noches de merienda, juegos de mesa y cine. Sin él, esta tesis no habría sido posible.

A Irene, por haberme hecho sentir que somos un equipo desde el principio, por los paseos liberadores al quiosco, las sentadillas matutinas y las risas en los momentos más absurdos.

A Cristina, por hacer más divertidos los días, por empoderarnos a cada momento, por ser mi gran aliada tanto dentro como fuera del laboratorio. Y por el cajón de chocolatinas, también.

A Pedro, por seguir siendo mi postdoc incluso estando en diferentes ciudades. Por los toques de realidad y de ironía que mejoran cualquier situación.

A mis amigos, mi otra familia. Por ser una medicina necesaria en mi vida, por no poder imaginarme sin ellos. A los de toda la vida, por seguir ahí y crecer conmigo. A los nuevos, por haber llegado para quedarse. Gracias por formar parte de mí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Receptores de glutamato.....	1
1.1.Receptores ionotrópicos de glutamato.....	3
1.1.1 Receptores de NMDA.....	3
1.1.2. Receptores de AMPA.....	5
1.1.3. Receptores de Kainato.....	8
1.2.Biología molecular de los receptores de kainato.....	11
1.2.1. Subunidades de los receptores de Kainato: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 y GluK5.....	11
1.2.2. Cómo se distribuyen las subunidades de los receptores de tipo Kainato.....	12
1.2.3. Variedad estructural de los receptores de tipo Kainato.....	13
1.2.4. Propiedades funcionales de los receptores de Kainato.....	15
1.2.4.1. <i>Propiedades biofísicas de los receptores de Kainato como canal único.....</i>	<i>15</i>
1.2.4.2. <i>Propiedades de desensibilización de los receptores de tipo Kainato</i>	<i>16</i>
1.2.4.3. <i>Propiedades de activación de los receptores de Kainato.....</i>	<i>17</i>
1.2.4.4. <i>Propiedades farmacológicas de los receptores de tipo Kainato.....</i>	<i>18</i>
1.2.4.5. <i>Papel fisiológico de los receptores de tipo Kainato</i>	<i>19</i>
1.3.El cerebelo.....	21
1.3.1. Citoarquitectura del cerebelo.....	22
1.3.1.1. <i>Organización a nivel celular del cerebelo.....</i>	<i>24</i>
1.3.2. Receptores de Kainato en el cerebelo.....	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35

3.1. Obtención del tejido	35
3.2. Soluciones	38
3.3. Registros electrofisiológicos	40
3.3.1. Diseño experimental	40
3.3.2. Técnica de registro de corrientes postsinápticas excitadoras provocadas	41
3.3.3. Determinación de mecanismos postsinápticos o presinápticos	45
3.4. Protocolos empleados en los experimentos realizados	45
3.4.1. Experimentos realizados para estudiar los mecanismos de acción de Kainato (KA) sobre la liberación de glutamato.	45
3.4.1.1. <i>Efectos de KA sobre la amplitud de las EPSCs</i>	45
3.4.1.2. <i>Efectos de KA sobre la amplitud de las EPSCs + NBQX, Rp-Br-cAMP, H-89, forskolina, filantotoxina, rianodina, tapsigarguina, nimodipina, toxina pertúsica, CMZ, Calphostin-C y W-7</i>	46
3.5. Análisis de datos	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Papel facilitador de los receptores de tipo Kainato en la regulación de la liberación de glutamato en la sinapsis establecida entre las células de Purkinje y las fibras paralelas del cerebelo de ratón	48
4.1.1. La activación de los receptores de Kainato por 3 μ M KA produce un incremento en la amplitud de las corrientes postsinápticas de tipo NMDA en la sinapsis fibras paralelas-células de purkinje	48
4.1.2. La facilitación de la transmisión glutamatérgica mediada por la activación de KAR en la sinapsis PF-PUC requiere de señalización dependiente de cAMP y PKA	54
4.1.3. La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC está mediada por KAR permeables a Ca^{2+}	59
4.2. Papel inhibidor de los receptores de tipo Kainato en la regulación de la liberación de glutamato en la sinapsis establecida entre las células de Purkinje y las fibras paralelas del cerebelo de ratón	66

4.2.1.	La activación de los receptores de Kainato por medio de KA 3 μ m produce una disminución en la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras de NMDA en la sinapsis fibras paralelas-células de Purkinje.....	66
4.2.2.	La depresión de la transmisión glutamatérgica mediada por KA en la sinapsis PF-PuC depende de la señalización dependiente de cAMP y de PKA.....	69
4.2.3.	La depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR requiere proteína G en la sinapsis PF-PuC.....	71
4.2.4.	La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC no está mediada por KAR permeables a calcio y no requiere de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares.....	73
5.	DISCUSIÓN.....	75
5.1.	La activación de los receptores de Kainato produce un aumento de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC de cerebelo.....	75
5.1.1.	El Efecto de KA sobre la amplitud de los eEPSCs se debe a la activación de receptores de KA.	75
5.1.2.	El Mecanismo de acción de los KARs en la facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis PC-PuC de cerebelo es presináptico.....	75
5.1.3.	La facilitación de la transmisión glutamatérgica mediada por KARs en la sinapsis PF-PuC requiere señalización dependiente de cAMP.....	77
5.1.4.	La facilitación de la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PuC está mediada por KAR presinápticos permeables a Ca^{2+}	77
5.2.	La activación de los receptores de Kainato produce una disminución de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC de cerebelo.....	79
5.2.1.	El Efecto inhibitorio de KA sobre la Amplitud de los EPSCs se debe a la Activación de Receptores de KA.....	79
5.2.2.	El mecanismo de acción de los KARs en la disminución de la liberación de glutamato en la sinapsis PC-PuC de cerebelo es presináptico.....	79
5.2.3.	La inhibición de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC depende de la señalización dependiente de cAMP.....	80
5.2.4.	La depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR requiere de la activación de proteína G en la sinapsis PF-PuC.....	80

5.2.5. La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC no está mediada por KAR permeables a calcio y no requiere de la liberación de calcio de las reservas intracelulares.....	81
5.3. Implicaciones.....	81
6. CONCLUSIONES.....	85
7. REFERENCIAS.....	86
8. ANEXOS.....	105

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

AMPA: receptor de AMPA

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ATP: adenosín trifosfato

ATPA: ácido (RS)- α -amino-3-hidroxi-5-tert-butil-4-isoxazolepropiónico

Ca²⁺: ion calcio

NBQX: 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina

DAG: diaglicerol

DNA: ácido desoxirribonucleico

EEM: error estándar de la media

fS: fentosiemens

GABA: ácido γ -aminobutírico

GluK1-5: subunidades del receptor de kainato

GTP: guanosín trifosfato

Hz: Hercio

iGluR: receptor de glutamato ionotrópico

Gli: glicina

IP3: inositoltrifosfato

K⁺: ion sodio

KAR: receptor de kainato

KBPs: kainate binding proteins (proteínas que unen kainato)

kHz: kilohercio

LTD: long Term Depression (Depresión de larga duración)

LTP: long Term Potentiation (Potenciación de larga duración)

M Ω : megaohmios

Mg²⁺: ion magnesio

mGluR: receptor de glutamato metabotrópico

min: minuto

mM: milimolar

mOsm: miliosmoles

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

ms: milisegundo

mV: milivoltio

Na⁺: ion sodio

nM: nanomolar

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: receptor de NMDA

pA: picoamperio

PF: fibras paralelas

PKA: proteína kinasa A

PKC: proteína kinasa C

PIP₂: difosfato de inositol

PLC: fosfolipasa C

PPF: facilitación por pares de pulsos

PPR: ratio de respuesta por pares de pulsos

pS: picosiemens

PTx: toxina pertúsica

PuC: Células de Purkinje

sEPSCs: corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas

SNC: Sistema Nervioso Central

Zn⁺: ión zinc

μM: micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RECEPTORES DE GLUTAMATO

Glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos. Glutamato media sus acciones activando a los receptores de glutamato. Estos receptores participan en la transmisión sináptica normal en diferentes sinapsis, en procesos de plasticidad como la potenciación de larga duración (LTP) y la depresión de larga duración (LTD) que se consideran la correlación celular y molecular de los procesos de la memoria y aprendizaje, en la sinaptogénesis y la maduración neuronal. y, además, errores en el funcionamiento de este sistema puede ser el origen de algunos tipos de epilepsia y puede contribuir al desarrollo de trastornos del SNC como la enfermedad de Alzheimer, Corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, hipoglucemia o isquemia cerebral (Traynelis et al., 2010; Flores et al., 2011).

Los receptores de glutamato se dividen clásicamente en dos grandes familias: ionotrópica y metabotrópica (Figura 1). Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) participan en la neurotransmisión rápida en el sistema nervioso, estos receptores ionotrópicos se clasifican en tres tipos según el agonista que los activa con mayor afinidad en: receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) (NMDAR), Receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiónico) (AMPA) y receptores de kainato (KAR). Estos receptores forman un canal con una selectividad diferente dependiendo del tipo de receptor, siendo todos ellos permeables a Na^+ y K^+ y, además, los NMDAR son permeables al Ca^{2+} , algunos AMPAR y KAR también permeables al Ca^{2+} dependiendo de su composición en subunidades. Son proteínas integrales de membrana, formadas por 4 subunidades (tetrámeros), siendo homómeros o heterómeros (Traynelis et al., 2010).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) también participan en la neurotransmisión, se acoplan a las proteínas G y se dividen en ocho tipos (mGluR 1-8) y tres grupos de receptores: mGluRs del Grupo I: incluye los receptores mGluR1 y mGluR5. Estos receptores se acoplan positivamente a la fosfolipasa C (PLC), lo que facilita la conversión de difosfato de inositol (PIP2) en diacylglycerol (DAG) y trifosfato de

inositol (IP3). DAG activa la proteína quinasa C (PKC) que fosforila diferentes sustratos e IP3 causa numerosos efectos intracelulares, incluida la facilitación de la liberación de Ca^{2+} de las tiendas intracelulares. Grupo II mGluRs: incluye los receptores mGluR2 y mGluR3. Estos receptores están acoplados negativamente a la formación de AMPc mediada por adenilato ciclasa y mGluRs del Grupo III: incluye los receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Estos receptores están acoplados negativamente a la formación de AMPc mediada por la adenilato ciclasa (Niswender y Conn, 2010).

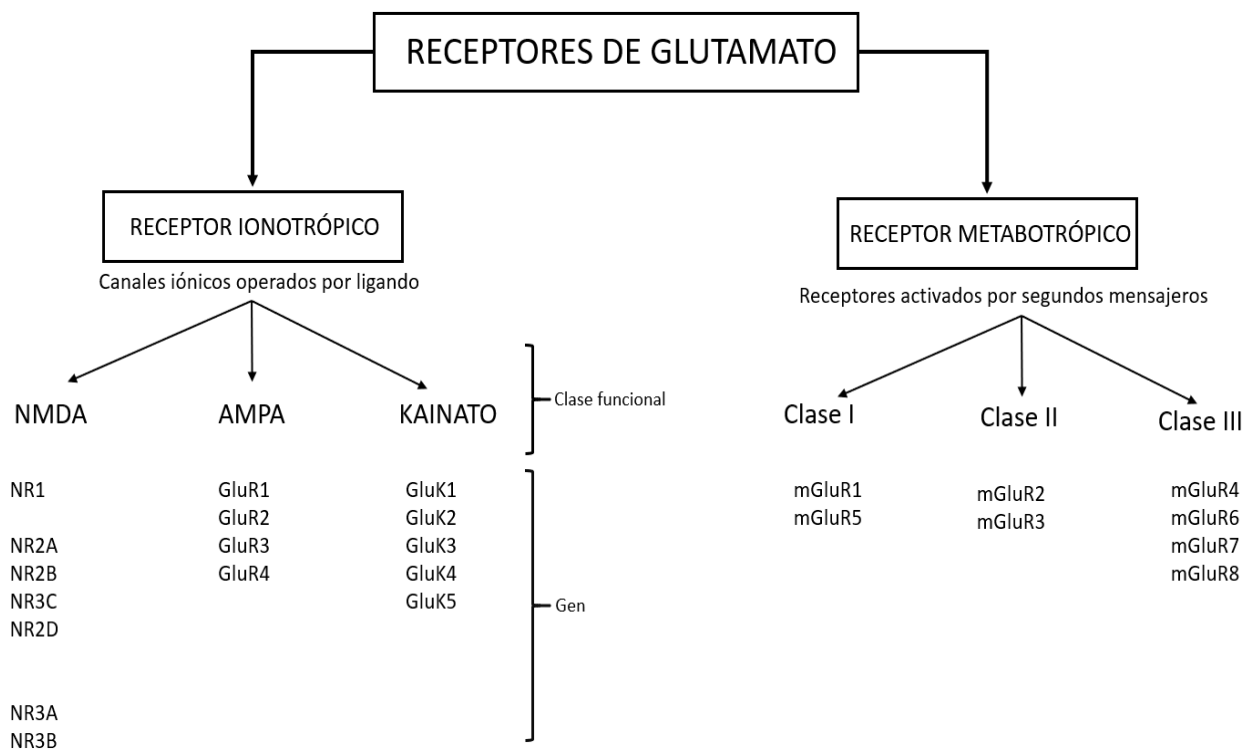


Figura 1.- Clasificación de los receptores de glutamato. Modificado de Flores-Soto et al. (2012).

1.1.1. RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

1.1.1.1. RECEPTORES DE TIPO NMDA

Los receptores ionotrópicos de tipo NMDA están compuestos por cuatro subunidades, la combinación concreta de estas subunidades determina las propiedades funcionales de estos receptores NMDA (Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; ver Yashiro y Philpot, 2008 para revisión). Estas subunidades son dos NMDAR1 (NR1, GluN1) obligatorias y la combinación de NMDAR2 (NR2A-D, GluN2A-D) y NMDAR3 (NR3A-B, GluN3A-D) (Hassel y Dingledine, 2012), formando en conjunto un canal iónico altamente permeable al Ca^{2+} (Lynch y Guttman, 2001). Gracias al uso de sustancias agonistas como el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y sustancias antagonistas como la MK-801 y D-AP5, se ha podido llevar a cabo la caracterización de estos receptores y conocer cómo forman parte de diversos procesos neurológicos a nivel patológico y fisiológico en el SNC.

Los receptores de tipo NMDA son canales iónicos que posibilitan el paso de iones K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , presentando dos lugares de unión para ligando, ya que necesita de la unión simultánea de dos agonistas para activarlo: glutamato (Glu) y glicina (Gli). Es por ello que estas sustancias son referidas como co-agonistas del receptor NMDA. Por otra parte, en condiciones fisiológicas, este receptor se encuentra bloqueado por el ion Mg^{2+} , siendo dependiente del voltaje el desbloqueo, ocurriendo, concretamente, al despolarizarse la membrana (Flores-Soto et al., 2012). Así mismo, presentan una cinética lenta para activarse e inactivarse, y se mantienen abiertos de forma prolongada (Nowak et al., 1984; Lester et al., 1990)

Los receptores de tipo NMDA muestran diversas propiedades que los definen. Además de un sitio de unión para glicina, presentan diferentes sitios de regulación alostérica (siendo objetivo de sustancias provenientes tanto desde fuera como desde dentro de la célula), incluyendo un lugar de unión en la luz del canal para ketamina, fenciclidinas (PCP), MK-801 y otro sitio de unión al Zn^{2+} (que actúa como inhibidor de

respuestas producidas por el agonista independientemente del voltaje) (Westbrook y Mayer, 1987).

Así mismo, las respuestas de estos receptores se ven potenciadas por las poliaminas espermidina y espermina, respuestas que también son muy sensibles a concentraciones extracelulares elevadas de H^+ (Traynelis et al, 2010), así como a estados redox para el zinc y para protones, ejerciendo un efecto regulador de la actividad de este receptor, ya que permite el aumento o reducción del flujo de Ca^{2+} a través de la actividad del receptor bajo diversas condiciones a nivel fisiológico o patológico (Flores-Soto et al., 2012). Un ejemplo de este fenómeno son el efecto que ejercen agentes reductores de sulfhidrilo como el ditioneitol y el ácido dihidrolipoico, que potencian las corrientes de NMDA a través de la formación de grupos tiol libres, mientras que los agentes oxidantes como el 5,5-ditio-bis (ácido 2- nitrobenzoico) y el glutatión oxidado inhiben las corrientes por formación de enlaces disulfuro (Aizenman *et al*, 1989; Sucher y Lipton, 1991; Köhr *et al*, 1994; Choi y Lipton, 2000).

En cuanto a las subunidades que conforman el receptor, podemos destacar que la subunidad NR1 (GluN1) se encuentra presente en prácticamente todas las neuronas del SNC (Moriyoshi, et al., 1991), y forma homómeros que resultan en canales que pueden ser activados por glutamato o NMDA en presencia de glicina, aunque muestran amplitudes menores en las corrientes con respecto a receptores compuestos por las subunidades NR1 (GluN1) y NR2 (GluN2) (Lynch y Guttman, 2001). En cambio, las subunidades NR2 (GluN2) no forman homómeros que resulten en receptores funcionales, por lo que no son consideradas como moduladoras. Así mismo, estas subunidades, muestran patrones de expresión distintos en la medula espinal y en el cerebelo, que son modificados durante el desarrollo (Monyer et al., 1994). Un fenómeno similar ocurre con las subunidades NR3 (GluN3), ya que al igual que las NR2 (GluN2), actúan como subunidades reguladoras, de manera que al estar presentes disminuyen las corrientes iónicas que se generan a causa de la activación de los heterómeros NR1 (GluN1) y NR2 (GluN2) (Das et al, 1998).

Los receptores de tipo NMDA forman parte de mecanismos celulares que están involucrados en fenómenos de plasticidad sináptica como la potenciación de larga duración, e incluso en procesos de muerte celular en los que el glutamato actúa como mediador.

1.1.1.2. RECEPTORES DE TIPO AMPA

El receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (o receptor AMPA) es un receptor ionotrópico transmembrana para glutamato, que actúa de mediador de la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC de los mamíferos, siendo objetivo en un gran número de vías de señalización encargadas de regular las sinapsis glutamatérgicas. Estos receptores presentan una estructura en forma de canal, siendo permeable a iones como Na^+ y Ca^{2+} (Traynelis et al, 2010), por lo que facilita que la regulación de la función sináptica sea altamente precisa en procesos fisiológicos como el aprendizaje y la memoria (Alkon y Nelson, 1990). Así mismo, en estados patológicos como adicciones o trastornos neurodegenerativos, se producen modificaciones de estos receptores, presentes en sinapsis funcionales (Bassani et al, 2012).

Los receptores de tipo AMPA son tetrámeros compuestos por cuatro subunidades GluR1-4 (GluA1-4), que, al combinarse, generan canales iónicos con diferentes propiedades fisiológicas, ya que pueden ser tetraméricos, heteroméricos u homoméricos (Malinow y Malenka, 2002). Así mismo, estas subunidades presentan dos variantes distintas, llamadas “flip” o “flop”, que se generan dependiendo del procesamiento de los ARNm (Sommer et al, 1990). Gracias a este procesamiento distinto, se determinan las propiedades cinéticas y farmacológicas del canal del receptor (Weimin et al, 2009). Por ejemplo, las variantes flop se desensibilizan más rápido en respuesta al glutamato que las variantes flip, además de ser menos sensibles a la ciclotiazida (que evita que estos receptores se desensibilicen) (Sommer et al, 1990). Así mismo, en estadios tempranos del desarrollo son más habituales las variantes flip, mientras que las variantes flop son más comunes en los estadios maduros (Zheng et al, 2012).

A pesar de que las subunidades de estos receptores son homólogas en aproximadamente un 68% entre ellas, las propiedades de tipo funcional de estos receptores, así como su tráfico, son dependientes de las subunidades que los forman (Collingridge et al, 2004).

La formación de los receptores AMPA se da de forma mayoritaria en el SNC como heterotetrámeros formados por las subunidades GluR2 (GluA2) junto a GluR1 (GluA1) o GluR3 (GluA3) (Derkach et al, 2007; Trayelis et al, 2010). Cada subunidad se compone por tres dominios transmembrana (M1, M2, M3 y M4), así como por un lazo en el dominio M2, un dominio a nivel extracelular amino-terminal o N-terminal, y otro dominio intracelular carboxi-terminal o C-terminal, que contiene dominios reguladores que son objetivo de diversas vías de transducción de señal de tipo intracelular (Incontro, 2013). Es en el extremo C-terminal la zona en la que más se diferencian las subunidades, tanto a nivel estructural como funcional. En dicha zona existen dominios reguladores que son objetivo de un gran número de vías de transducción de señales a nivel intracelular (quinasas, fosfatasas, etc), además de interactuar con diversas proteínas de andamiaje encargadas de unir proteínas de señalización y proteínas del citoesqueleto (actina) (Collingridge et al, 2004; Nicoll et al., 2006).

Así mismo, las multiproteínas que conforman los receptores de tipo AMPA (con proteínas diversas y subunidades auxiliares), intervienen en diferentes aspectos a nivel funcional, incluyendo el tráfico, estabilización e iniciación de la sinapsis, e incluso en la regulación de la síntesis dendrítica local y el número de receptores presentes en las sinapsis. Esta actividad dependiente de la manera en la que se expresan e interactúan las diferentes subunidades surge durante el proceso de desarrollo en regiones concretas del cerebro, de manera que diversos mecanismos participan en la enorme complejidad que presentan a nivel funcional los receptores de tipo AMPA, así como de la regulación de la sinapsis (Derkach et al, 2007).

Se debe destacar la importancia que tiene para las propiedades del canal de los receptores de tipo AMPA el aminoácido 586 (sitio Q/R). Esta posición se encuentra

ocupada por una glutamina (Q) en tres de las cuatro subunidades de estos receptores, por lo que los canales que están formados por cualquiera de dichas subunidades muestran una particularidad concreta: permitir el paso de más corriente entrante (que dan lugar a potenciales negativos de membrana) que de corriente saliente (dan lugar a potenciales positivos de membrana), además de ser mucho más permeables a Ca^{2+} (Hollman et al, 1991; Burnashev et al., 1992).

Estos receptores se reparten por numerosas partes del cerebro, y según la etapa del desarrollo y la subunidad concreta, se observan cambios en su expresión. La subunidad GluR2, determina el comportamiento que muestra el canal, siendo fenotípicamente dominante. Un ejemplo de ello es que esta subunidad, en el cerebro adulto, está sujeta a edición del ARNm de manera que el codón de glutamina genómica (Q) para el residuo 607 puede ser sustituida por arginina (R), por lo que este cambio hace que estos receptores muestren rectificación saliente (a potenciales de membrana positivos permiten entrar más corriente que a potenciales negativos), así como que no sean permeables a Ca^{2+} (Jonas y Burnashev, 1995; Kask et al, 1998). Es por ello, que la subunidad GluR2 (GluA2) en forma editada domina diversas propiedades de estos receptores, como la conductancia del canal, la permeabilidad a Ca^{2+} , la afinidad que muestra el receptor para el glutamato, la cinética y la unión de la subunidad al receptor.

Por otra parte, los canales abiertos de los receptores de tipo AMPA que carecen de la subunidad GluR2 (GluA2), interactúan intensamente con las poliaminas intracelulares endógenas (Bownie et al, 1998). Estos receptores muestran la permeabilidad al Ca^{2+} aumentada, así como la conductancia del canal, la probabilidad de que se abra y se rectifique. Sin embargo, los receptores de tipo AMPA que sí contienen la subunidad GluR2 (GluA2) no presentan rectificación y presentan valores menores de la conductancia del canal, así como de la permeabilidad al Ca^{2+} y la probabilidad de apertura (Swanson et al. 1997; Burnashev et al., 1992). Es por ello que el hecho de que la subunidad GluR2 (GluA2) esté o no presente, puede alterar intensamente las propiedades de los receptores de tipo AMPA, y por ende, de la transmisión sináptica.

Estos receptores están altamente presentes en capas superficiales de la corteza y en el hipocampo. En estructuras como el núcleo caudado, el putamen, y en capas profundas de la corteza se encuentran expresados de forma intermedia. Así mismo, además de formar parte de la transmisión sináptica rápida, los receptores de tipo AMPA participan de forma importante en diversas formas de plasticidad sináptica y en condiciones más patológicas, un aumento excesivo de la entrada de Ca^{2+} a través de ellos facilita la muerte neuronal.

1.1.1.3. RECEPTORES DE KAINATO

El ácido kaínico (KA) es una neurotoxina muy potente que se extrae del alga *Digenea simplex*. La palabra "Kainic" deriva del japonés "Kaininso" ("Makuri"), y significa "el fantasma del mar", y se trata de un agonista que activa tanto los KAR como los AMPAR (de la misma manera que el agonista de AMPAR, AMPA, puede activar KARs). Kainato es conocido por sus potentes acciones epileptogénicas (Nadler et al., 1978; Falcón-Moya et al., 2018).

KA, así como otros agonistas, activan KAR que son tetrámeros que surgen de distintas combinaciones de cinco subunidades, llamadas: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 y GluK5 (anteriormente eran conocidas como GluR5, GluR6, GluR7 y KA1 y KA2, respectivamente). De estas subunidades, GluK1 y GluK3 pueden formar receptores funcionales homoméricos o heretoméricos, sin embargo, GluK4 y GluK5 solo pueden participar en receptores funcionales cuando están asociados con cualquiera de las subunidades GluK1, GluK2 o GluK3. Así mismo, no se combinan con las subunidades de AMPARs (Traynelis et al., 2010).

Los KAR se han descrito en gran variedad de invertebrados como moscas y nematodos (Lee, 2010; Li et al, 2016), así como en vertebrados en diversas especies de aves, peces y anfibios (Somogyi et al., 1990; Estabel et al., 1999; Atoji y Sarkar, 2019) además de los mamíferos. En mamíferos, los KAR se pueden observar en prácticamente todo el sistema nervioso, aunque su ubicación subcelular aún no se ha determinado completamente. Los KAR están ampliamente distribuidos en todo el SNC, como en las

células principales y las interneuronas del hipocampo, la amígdala lateral, los ganglios de la raíz dorsal, las células bipolares de la retina, la corteza cerebral y el cerebelo (Huettnner, 2003, Jane et al., 2009)).

La falta de conocimiento sobre estos receptores en comparación con otros receptores glutamatérgicos (AMPA o NMDAR) se ha debido a la falta de agonistas y antagonistas selectivos para receptores con composiciones de subunidades particulares y a la ausencia de anticuerpos específicos para las diferentes subunidades de KARs, por lo que muestra una gran limitación a la hora de explorar la distribución de estos receptores. Sin embargo, al utilizar técnicas de hibridación *in situ*, se ha observado que las células que presentan una expresión significativa de las subunidades de tipo kainato GluK1, GluK2, GluK3 y GluK5 se distribuyen por todo el SNC, incluidos el núcleo estriado, el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Traynelis et al., 2010). Asimismo, existe una alta expresión de la subunidad GluK4 en la región CA3 del hipocampo, así como en las neuronas granulares del giro dentado. El mensajero para la subunidad GluK5, por otro lado, aparece más abundantemente y más extensamente que el de la subunidad GluK4 o los de las otras subunidades (Jane, et al., 2009). Debido a que la técnica de hibridación *in situ* es informativa y no puede revelar la distribución subcelular de una subunidad específica, y debido a las limitaciones farmacológicas, todavía hay mucho que saber sobre la ubicación subcelular y la fisiología de estos receptores.

Los receptores de glutamato de tipo kainato son mediadores bien establecidos de la transmisión sináptica postsináptica y, a nivel presináptico, tienen un papel modulador en la regulación de la liberación de neurotransmisores. Con respecto a esto último, se ha demostrado que los KAR tienen actividad metabotrópica, para modular la liberación de glutamato y de GABA (para una revisión ver: Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007; Rodríguez-Moreno y Sihra; 2007B; Jane et al., 2009; Sihra y Rodríguez-Moreno, 2011; Rodríguez-Moreno y Sihra; 2011; Sihra y Rodríguez-Moreno, 2013; Negrete-Díaz et al., 2018). En algunas sinapsis glutamatérgicas excitadoras, la activación de los KAR puede ejercer una modulación bifásica, donde las bajas concentraciones de agonistas facilitan la liberación de glutamato, mientras que las altas concentraciones disminuyen la liberación del neurotransmisor (para una revisión, ver: Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007; Rodríguez-

Moreno y Sihra, 2007B). Los detalles mecanicistas de cómo se logra esto son objeto de investigación y, de hecho, la ubicación subcelular de los KAR responsables de la modulación presináptica sigue siendo discutible. También se han descrito diferentes papeles de los KAR en la plasticidad en LTP o LTD (Sihra et al., 2014).

Como otros receptores de glutamato, los KAR están directa o indirectamente involucrados en diferentes enfermedades, alteraciones del sistema nervioso y procesos de neurodegeneración y muerte celular. Como comentamos anteriormente, KA es una potente neurotoxina que induce directamente la epilepsia y se usa como modelo de epilepsia del lóbulo temporal (Nadler et al., 1978; Falcón-Moya et al., 2018). Varias líneas de investigación indican que el KA que activa directamente los KAR está involucrado en los desequilibrios excitadores e inhibidores asociados a la epilepsia. El uso de modelos animales para la epilepsia mediante el uso de inyecciones de KA ha permitido reproducir con gran detalle los síntomas observados en los seres humanos. La mayoría de los estudios sobre la implicación de los KAR en la epilepsia han estudiado efectos agudos inducidos por KA (Rodríguez-Moreno et al., 1997; Mülle et al., 1998; Smolders et al., 2002; Fritsch et al., 2014). Las mejores demostraciones del mecanismo de participación de los KAR en la epilepsia aguda provienen de estudios de inhibición de la liberación de GABA mediante la activación de receptores presinápticos de KA en las sinapsis hipocámpales interneuronas-CA1 (Rodríguez-Moreno et al., 1997; Rodríguez-Moreno et al., 1998, 2000). En la epilepsia crónica, se ha demostrado el papel de los KAR en las fibras musgosas del hipocampo que producen sinapsis aberrantes en las células granulares de la circunvolución dentada que expresan un alto número de KAR (Artinian et al., 2011; Peret et al., 2014). En seres humanos, los estudios genéticos de miembros de una familia afectada por epilepsia de ausencia juvenil idiopática encontraron niveles elevados de polimorfismos de Grik1 (Sander et al., 1997) y en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, también se encontraron subunidades GluK1 que con niveles aumentados de KAR (Li et al., 2010). En estudios clínicos, se ha encontrado que NS1209 (un antagonista de AMPA / KARs) disminuye los síntomas epilépticos (Swanson, 2009).

Diferentes estudios de neurotoxicidad indican claramente que los KAR podrían ser objetivos importantes para la neuroprotección en neuronas. El mecanismo por el cual

los KAR producen excitotoxicidad y muerte de células neuronales no se entiende bien principalmente debido a las limitaciones en las herramientas farmacológicas apropiadas. La toxicidad de los KAR implicados en la esclerosis múltiple también se ha encontrado en oligodendrocitos y mielina relacionada (Matute, 1998; Sanchez-Gomez y Matute, 1999) y también se ha encontrado daño en los niveles axonales, donde los antagonistas de AMPA / KARs lo impiden (Tekkok y Goldberg, 2001). Curiosamente, los KAR también están involucrados en el dolor, ya que están presentes en las raíces dorsales que activan los nociceptores. De hecho, hay ensayos clínicos que utilizan antagonistas de los KAR para tratar de prevenir el dolor, ya muestran algunos niveles de analgesia. (Swanson, 2009). Además, los KARs han estado involucrados en la isquemia (Xu et al., 2008, O'Neill et al, 2000), el dolor por migraña (Swanson, 2009), en la enfermedad de Alzheimer (Aronica et al., 1998), en la enfermedad de Parkinson (Luquim et al, 2006; Carson et al., 2009), en corea de Huntington (Wagster et al, 1994; Rubinsztein et al, 1997; MacDonald et al, 1999), en la esquizofrenia (Garey et al., 2006; Begni et al, 2002; Schiffer y Heinemann, 2007; Pickard et al., 2006), en la depresión (Wilson et al, 2006), en el trastorno bipolar (Begni et al, 2002; Schiffer y Heinemann, 2007), retraso mental (Motazacker et al., 2007) y en el autismo (Jamain et al., 2002; Bowie, 2008). En general, los antagonistas de KAR que contienen subunidades particulares pueden ser buenos objetivos para mejorar los síntomas o tratar diferentes alteraciones y enfermedades del SNC.

1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

1.2.1. SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE KAINATO: GLUK1, GLUK2, GLUK3, GLUK4 Y GLUK5.

Actualmente son conocidas cinco subunidades distintas que permiten la formación de los receptores de tipo kainato (Hollmann y Heinemann, 1994). Basándose en la similitud de sus secuencias, así como en las propiedades de sus agonistas para unirse, estas subunidades se dividen en dos familias distintas. Una de ellas se compone de las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3, cuya homología es del 70% aproximadamente (Egebjerg et al., 1991; Sommer et al., 1992), mientras que la otra familia está compuesta

por las subunidades GluK4 y GluK5, aunque en este caso solo muestran un 40% de homología con la otra familia.

Es ampliamente extendida la creencia de que las subunidades de los receptores de glutamato muestran la misma forma en la membrana, de manera que la mitad que forma el extremo aminoterminal de cada una de las subunidades se encuentra situada extracelularmente. Así mismo, muestran cuatro partes hidrofóbicas, de manera que tres son transmembranales y otro se sitúa dentro de la membrana, colocado en forma de asa y mirando hacia el citoplasma, formando el poro del canal (Bennett y Dingledine, 1995).

Por otra parte, solo GluK1 y GluK2 pueden verse sometidas a ediciones postranscripcionales de ARNm, por medio de cambiar un aminoácido del poro encargado de modificar las propiedades para la permeabilidad del mismo (Sommer et al., 1991). Así mismo, la edición del sitio Q/R define la permeabilidad del canal al Ca^{2+} , así como su conductancia. De esta manera, aquellos receptores que no han sido del todo editados actúan con una permeabilidad al Ca^{2+} ligeramente más elevada (Burnashev et al., 1995, 1996), y mostrando una conductancia también mayor en comparación con aquellos receptores que muestran editadas una o varias subunidades (Swanson et al., 1996). Así mismo, la subunidad GluK2 muestra también (además del sitio Q/R), otros dos sitios más donde editar el ARNm dentro del primer dominio transmembrana (Köhler et al., 1993).

1.2.2. CÓMO SE DISTRIBUYEN LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

Gracias a técnicas como la hibridación in situ se han podido conocer la distribución y disposición de los receptores de tipo kainato, ya que esta técnica permite determinar aquellas células que presentan ARNms de estos receptores concretos (Bureau et al., 1999). Así mismo, diversos autores han establecido la presencia de subunidades de estos receptores tanto en neuronas individuales (Ghasemzadeh et al., 1996) como en poblaciones reducidas de células situadas en regiones concretas más aisladas (Paarmann et al., 2000).

Así mismo, gracias a esta técnica se ha podido observar que las neuronas que presentan expresiones de las subunidades de los receptores de tipo kainato GluK1, GluK2, GluK3 y GluK5 se reparten por todo el SNC, incluyendo zonas como el núcleo estriado, el hipocampo, la corteza y el cerebelo. Por ejemplo, se ha visto una enorme expresión de la subunidad GluK4 en el hipocampo, concretamente en la región CA3, así como en las células granulares situadas en el giro dentado. En cambio, el mensajero de la subunidad GluK5 aparece de forma más abundante y extensa que el del resto de subunidades (Huettnner, 2003).

Como se ha indicado, la expresión de las subunidades del receptor de tipo kainato se ha observado en multitud de sitios del SNC, de forma muy heterogénea, pero a modo de resumen podemos señalar que las zonas principales son: neuronas del ganglio de la raíz dorsal, núcleo septal, subículo, la corteza del cíngulo y la corteza piriforme, además de las células de Purkinje situadas en el cerebelo (zonas donde se ha observado el transcrito de la subunidad GluK1) (Bettler et al., 1990); células granulares de la corteza cerebelar, así como en el giro dentado y la región CA3 en el hipocampo, así como en el estriado, siendo estas zonas abundantes de la subunidad GluK2; zonas profundas del córtex cerebral, el hipocampo, el estriado y neuronas inhibitoras de la capa molecular situada en el cerebelo, que muestran la presencia de la subunidad GluK3 a bajos niveles; de nuevo, la región CA3 del hipocampo, donde aparece de forma casi exclusiva la subunidad GluK4 (aunque se observa también en giro dentado, córtex entorrinal y amígdala) (Werner et al., 1991); y por último, en todos los núcleos casi en su totalidad del SN, donde se expresa el mensajero de la subunidad GluK5 (Rodríguez-Moreno, et al., 2000).

1.2.3. VARIEDAD ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

Los receptores de tipo kainato presentan la misma estructura transmembrana, así como la misma estequiometría que el resto de receptores de glutamato (AMPA y NMDA) (Madden, 2002), de esta forma, se trata de tetrámeros cuyos monómeros tienen sitios

específicos de unión al ligando, que colaboran para formar la luz del canal con secuencias de aminoácidos concretas. Esta luz del canal se compone de residuos hidrofóbicos que se hunden hasta la membrana, formando una estructura con forma de alambre. Así mismo, además de la secuencia hidrofóbica (M2), las subunidades presentan tres segmentos transmembrana (M1, M3 y M4), que se organizan de forma que el dominio amino-terminal (o N-terminal) de cada proteína sea extracelular, y el extremo C-terminal se sitúe de forma intracelular (Taverna et al., 1994; Bennet y Dingledine, 1995).

En los receptores de tipo kainato, al igual que ocurre en los de tipo AMPA, el sitio de unión del glutamato parece ser que se compone de restos que se distribuyen entre el dominio N-terminal más alejado (S1) y la conexión entre los segmentos transmembrana M3 y M4 (S2) (Stern-Bach et al., 1994). Receptores con elevada y baja sensibilidad para agonistas diferentes (AMPA y KA) son formados por restos concretos en S2 (Fleck et al., 2003). No obstante, es posible que la estructura verdadera del sitio de unión del KA muestre importantes diferencias entre los diferentes receptores de glutamato, lo que explicaría por qué algunos receptores de tipo KA son incapaces de unir AMPA, mientras que los receptores de tipo AMPA sí pueden unir KA con elevada afinidad.

Concretamente, los canales homoméricos formados por la subunidad GluK2 son insensibles a AMPA, así como a su derivado ATPA (ácido 5-tertbutil-4-isoxasolpropiónico), y los homómeros de la subunidad GluK3 muestran una total insensibilidad al AMPA y al domoato así como una baja sensibilidad al glutamato (Schiffer et al., 1997). Así mismo, las subunidades GluK1, GluK2 y GluK3 se pueden combinar unas con otras formando receptores funcionales, o bien se pueden combinar con las subunidades GluK4 y GluK5, formando uniones heteroméricas.

Inicialmente, la subunidad GluK1 fue descrita en dos configuraciones moleculares, diferentes según si estaba presente o ausente un fragmento de 15 aminoácidos en el extremo N-terminal, de manera que se denomina GluK1-1 si dicho fragmento está presente o GluK1-2 si está ausente. Además de esto, diversos estudios muestran que, además de estas configuraciones, existen otras dos configuraciones

moleculares añadidas para GluK1-2, de manera que se diferencian por las regiones del extremo C-terminal, pudiendo mostrar tres regiones C-terminal distintas, denominadas GluK1-2a la más corta y GluK1-2b y GluK1-2c las más largas (Sommer et al., 1992). Esta subunidad GluK1 forma receptores que pueden ser activados tanto por KA como por domoato y AMPA, además de por glutamato.

1.2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES DE KAINATO.

1.2.4.1. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS RECEPTORES DE KA COMO CANAL ÚNICO.

Ha sido en sistemas de expresión heterólogos principalmente donde se han estudiado las propiedades cinéticas de estos receptores, encontrándose que la conductancia de los receptores homoméricos (con las subunidades GluK1 o GluK2) que forman un canal único, se mueve en el rango de entre 2.9 y 5.4 picosiemens (pS) (Swanson et al., 1996).

La conductancia del canal único de aquellos receptores que presentan la subunidad GluK1 o GluK2 se ve reducida cuando se edita el sitio Q/R, y se revierte de forma parcial cuando se coexpresa con la subunidad GluK5 (Swanson et al., 1996). Concretamente, presentan una conductancia de menos de 200 fentosiemens (fS) aquellos canales homoméricos con la subunidad GluK1, pero en canales en los que se coexpresa la subunidad GluK5 aumenta hasta 950 (fS). Lo mismo ocurre en los canales homómeros de GluK2, cuya conductancia oscila entre 230 y 260 fS, aumentando entre 570 y 700 fS en heterómeros con la subunidad GluK5 coexpresada.

A día de hoy no se sabe bien cómo se relacionan entre sí las subunidades de los receptores de tipo kainato, ya que difícilmente se puede encontrar una razón que explique cómo las subunidades GluK5, que son las que muestran una afinidad más elevada para kainato, reducen la afinidad para ese mismo ligando cuando se ensamblan con las subunidades GluK1 o GluK2 para crear receptores heteroméricos (Howe, 1996).

Así mismo, se ha comprobado que en los receptores de glutamato la corriente media de canal único depende también del número de lugares de unión para agonistas que estén ocupados, siempre y cuando el receptor no pase a un estado de desensibilización (Rosemund et al., 1998).

1.2.4.2. PROPIEDADES DE DESENSIBILIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

Los receptores de tipo kainato tienen como característica principal, entre otras cosas, que se activan y desactivan rápidamente. En presencia del agonista, la corriente de estos receptores va decayendo de forma exponencial (Huettner et al., 2003). No obstante, es difícil determinar el valor exacto de la velocidad de desensibilización, aunque se sabe que este valor depende del tipo de célula y del subtipo de receptor. Para determinar este valor se ha llegado a la conclusión de que lo mejor es medir la constante de tiempo de decaimiento de la corriente a concentraciones muy elevadas del agonista, para de esta manera evitar un proceso de unión lento del agonista que pueda llevar a confusión. Así mismo, al estar aumentada la concentración del ligando, la tasa de decaimiento de la corriente se acerca al valor real del tiempo de desensibilización, que es un valor aproximado a un valor asintótico (Huettner, 2003).

Gracias a esta estrategia se ha podido establecer que para los homómeros GluK2 y para los receptores de kainato del hipocampo es de entre 11 y 13 ms, así como para los canales presentes en parches de membrana escindidos (Traynelis y Wahl, 1997).

Por otra parte, en los receptores de tipo kainato ocurre que la recuperación de un estado desensibilizado se da lentamente y depende del tipo de agonista, de manera que, por ejemplo, cuando se aplica glutamato y se dan dos pulsos, las respuestas surgidas son del mismo tamaño en un intervalo de unos 15 segundos, cosa que no se da cuando se aplica KA, ya que tiene que pasar 1 minuto entre ambos pulsos para que ocurra lo mismo (Huettner, 2003).

Por otra parte, otra manera de variar la recuperación de estados de desensibilización es a través de la composición de las subunidades de estos receptores, de manera que los receptores homoméricos GluK1 tienen una tasa de recuperación más elevada, de minutos, mientras que para los heterómeros con las subunidades GluK1/GluK5 es de en torno a 12 segundos.

Como hemos comentado anteriormente, el hecho de añadir subunidades GluK5 al receptor de kainato disminuye su afinidad para el ligando, por lo que puede que una recuperación rápida de un estado de desensibilización se deba a una tasa rápida de disociación del propio agonista, aunque hay pocas probabilidades de que se deba solo a esto, ya que el ácido domoico (agonista que desensibiliza a estos receptores de forma parcial), se disocia de forma más rápida de lo que se recupera el canal (Swanson et al., 1997). Sea como sea, el hecho de que existan diferencias tan remarcadas en el tiempo entre el estado de desensibilización y el estado de recuperación señala que los receptores están la mayor parte del tiempo en estado de desensibilización.

1.2.4.3. PROPIEDADES DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

Los receptores de tipo kainato muestran curvas de activación e inactivación que se solapan, lo que indica que hay concentraciones de agonistas que pueden ser tan altas como para que se abra el canal y a la vez, tan bajas como para desensibilizarlo de forma incompleta. Por ejemplo, en el caso del glutamato la concentración es de 100 μM . A este tipo de concentraciones de agonistas se le conoce como “corriente-ventana”, como predijeron Hodgkin y Huxley durante el transcurso de su investigación de las curvas de activación e inactivación en canales de sodio (Andrade-Talavera et al., 2012).

1.2.4.4.PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

Los receptores de tipo kainato se ven activados y llevados a estados de desensibilización por el agonista kainato, y se ven activados también por domoato, aunque esta sustancia solo es capaz de desensibilizarlos de forma parcial. Así mismo, el ATPA (ácido 5-tert-butil-4-isoxazolpropiónico, un derivado del AMPA) y el (S)-5-iodowillardina (derivado de willardina) son parcialmente selectivos en aquellos receptores que muestran la subunidad GluK1, aunque el ATPA también activa receptores heteroméricos que presenten las subunidades GluK2 y GluK5, aunque con una menor afinidad (Huettner, 2003).

Por otra parte, estos receptores se ven fuertemente desensibilizados por sustancias como el SYM281 (2S-4R-metil-glutamato), un tipo de diastereómero de 4-metilglutamato, por lo que se ha usado como antagonista de los receptores de tipo kainato (Jones et al., 1997).

Haciendo una revisión de literatura, encontramos que existe una mayor cantidad de fármacos selectivos para receptores de tipo AMPA que para receptores de tipo kainato, siendo ambos tipos de receptores difícilmente distinguibles entre ellos. Por ejemplo, el CNQX (6-cuano-7nitroquinoxalina), es un antagonista usado comúnmente en receptores no-NMDA, por lo que, una vez que se han bloqueado debidamente los receptores de tipo AMPA, se puede usar esta sustancia como antagonista de los receptores de tipo kainato. Para bloquear los receptores de tipo AMPA se suele usar de forma habitual el GYKI53665, o bien el LY303070 (el isómero activo del GYKI53665), de forma que con una cantidad de 1 μ M de esta sustancia es suficiente para bloquear estos receptores. Así mismo, el NBQX es una sustancia selectiva para los receptores de tipo AMPA sobre los de tipo kainato en el hipocampo en bajas concentraciones, en torno a 1 μ M (Mulle et al., 2000).

En cuanto a antagonistas selectivos para los receptores de tipo kainato, existen pocos sintetizados. Un ejemplo es el NS-102, cuya selectividad aumenta intensamente en receptores de tipo kainato que presentan la subunidad GluK2 en comparación con los

receptores de tipo AMPA (entre 10 y 20 veces mayor) (Verdoom et al., 1994), sin embargo, al ser este compuesto poco soluble en agua, su uso es complicado en experimentos fisiológicos. Otro ejemplo de antagonista es el LY32884, que muestra selectividad para receptores de tipo kainato que presenten la subunidad GluK1 (menor selectividad en heterómeros con subunidades GluK1/GluK2), y es inactivo en las subunidades de los receptores de tipo AMPA. El LY293558 actúa también como antagonista selectivo en receptores de tipo kainato con la subunidad GluK1, más que sobre aquellos con la subunidad GluK2 (Bortolotto et al., 1999), pero es muy poco efectivo sobre receptores AMPA. Por otro lado, el LY294486 también actúa con preferencia sobre receptores con la subunidad GluK1, de forma mucho más selectiva que para receptores de tipo AMPA (Clarcke et al., 1997). Además de estos compuestos, los receptores de tipo kainato se ven bloqueados por lantánidos (Huettner et al., 1998). Otros antagonistas ampliamente usados por ser altamente selectivos para los receptores de tipo kainato que presentan la subunidad GluK1 es el UBP302/296, así como el ACET, sustancia altamente potente también para los receptores de kainato con la subunidad GluK1 (inefectiva en los receptores con la subunidad GluK2 y GluK3) (Dargan et al., 2009).

1.2.4.4. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO.

1.2.4.4.1. PAPEL DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO EN LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA.

El ácido kaínico o kainato (KA) es una sustancia excitotóxica que provoca daño neuronal al ser administrada, así como crisis epileptiformes, de manera similar a lo que se observa en pacientes con epilepsia. Hace décadas, investigadores comenzaron a describir los efectos que muestra esta sustancia sobre la inhibición mediada por GABA, como Sloviter y Damiano (1981). Esto ha sido ampliamente reportado, pero debido al poco conocimiento que se tenía sobre estos receptores, su funcionamiento y sus características, no se pudieron obtener conclusiones claras sobre de qué manera participan en este proceso.

Durante décadas ha sido casi imposible detectar la presencia de los receptores de tipo kainato en las neuronas del SN, y tampoco se ha podido establecer qué papel fisiológico desempeñan en numerosos procesos. Sin embargo, gracias a la sustancia GYKI53655 (antagonista selectivo de los receptores de tipo AMPA), se ha podido indagar más a fondo sobre cómo participan los receptores de tipo kainato en la transmisión sináptica.

Concretamente, investigaciones realizadas con rodajas de hipocampo de roedor han facilitado la identificación de aquellas sinapsis en las que estos receptores median fracciones de corrientes sinápticas pequeñas, y se ha descubierto que se pueden inducir corrientes excitadoras postsinápticas con características farmacológicas que caracterizan a los receptores de tipo kainato en numerosas sinapsis del SNC (Vignes y Collingridge, 1997). Así mismo, además de acciones postsinápticas, los receptores de kainato también participan en acciones moduladoras de la liberación de glutamato y GABA, cuyos receptores se sitúan en los terminales presinápticos en sinapsis inhibitoras y excitadoras (Huettner, 2003; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2004; Negrete-Díaz et al., 2006; Negrete-Díaz et al., 2007; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007a; Rodríguez-Moreno y Sihra 2007b; Rodríguez-Moreno y Sihra, 2011).

1.3. EL CEREBELO

El cerebelo, o cerebellum (cerebro pequeño en latín) es una estructura presente en el SNC de todos los vertebrados. Esta estructura se ubica en la parte posterior del cráneo, de forma que se encuentra situado en la línea media de la región dorsal del tallo y encima del techo del cuarto ventrículo (García et al., 2009).

La zona central del cerebelo se llama vermis, y al igual que ocurre con el con el cuerpo calloso en el cerebro, a cada lado del mismo se ubican dos hemisferios cerebelosos, así como dos flóculos situados bilateralmente (**Figura 2**):

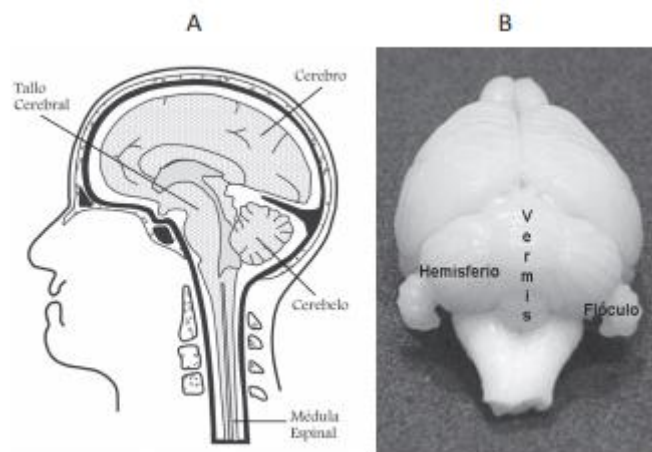


Figura 2.- Cerebelo. A. Corte sagital de la cabeza humana, donde podemos observar la ubicación del cerebelo. Se encuentra situado en la parte posterior del cráneo, en la línea media de la región dorsal del tallo cerebral. B. Vermis, hemisferios cerebelosos y flóculos en el cerebelo de rata. Obtenido de García et al. (2009).

Esta estructura es la única que puede recibir información todas las regiones del SNC prácticamente en su totalidad, incluyendo la médula espinal. Aunque se compone de una enorme cantidad de neuronas, más que cualquier otra estructura cerebral (Manto y Bastian, 2007), las tipologías de estas son relativamente bajas, ya que se encuentra organizado en tres capas que se distribuyen de manera uniforme por toda la estructura (Rodríguez et al., 2000). Pero, a pesar de lo que pueda parecer en base a una aparente simpleza estructural, el cerebelo es una estructura que ejerce una función fundamental en

procesos de control motor, de coordinación muscular final, de equilibrio y de aprendizaje a nivel motor (Voogd y Glickstein, 1997). Así mismo, cada vez existen más evidencias de que el cerebelo participa en numerosos procesos cognitivos y de aprendizaje (Middleton y Strick, 1998).

1.3.1. CITOARQUITECTURA DEL CEREBELO

La citoarquitectura de la corteza del cerebelo es la que con más detalle se conoce de todo el SNC. Inicialmente, su organización neuronal fue descrita por Santiago Ramón y Cajal a través del uso de la tinción de Golgi (técnica de tinción desarrollada por Camilo Golgi en 1873 y mejorada por Cajal), y más adelante, a través del uso de otras técnicas más avanzadas de microscopía se pudieron observar un mayor número de detalles no observados anteriormente (García et al., 2009). Así, en el cerebelo de mamíferos y aves podemos observar, en primer lugar, la presencia de un gran número de fisuras paralelas y transversales que van de un extremo a otro, surgiendo de esta manera las folias cerebelosas (Dubbeldam, 1998). Si realizamos un corte sagital del cerebelo, podemos apreciar lo que se conoce como “arbor vitae” (Haines, y Dietrichs, 2011), que se trata de una ramificación típica en forma de árbol que surge debido a que la corteza cerebelar rodea a la sustancia blanca, que se introduce dentro de cada una de las folias, dando lugar a esta característica forma (**Figura 3**).

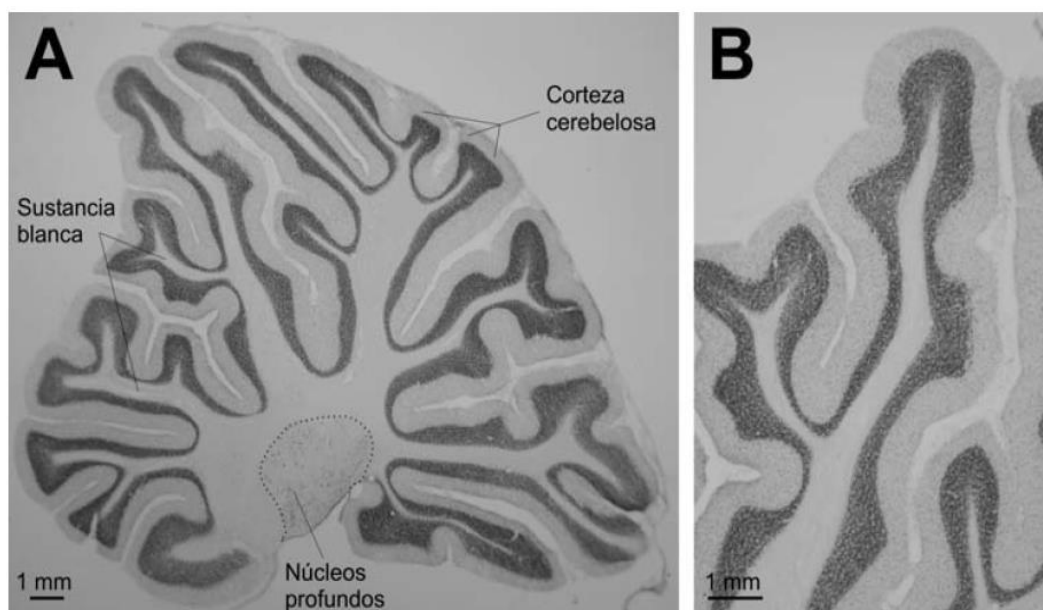


Figura 3.- Corte sagital de cerebelo de rata teñido con la técnica de Nissl. A. Se puede apreciar la ramificación típica en forma de árbol formada por la unión de la sustancia gris y la sustancia blanca. B. Detalle de una folia. Obtenido de Rodríguez et al., (2000).

En cuanto a la corteza del cerebelo, se divide de forma clara en tres capas: la capa molecular, que es la más externa y que contiene de forma mayoritaria axones de las células granulares (conocidas como fibras paralelas); la capa de las células de Purkinje, que es la capa intermedia, es donde se encuentran las dendritas de dichas células, así como las células en canasta y estrelladas en menor medida; y la capa granular, que es la más interna y que contiene en su mayoría células granulares, y en menor cantidad células de Golgi, células de Lugaro y otras células (Voogd y Glickstein, 1998). Así mismo, la corteza cerebelar recibe información aferente de, por una parte, las fibras musgosas, que provienen de diversos núcleos (como pontinos, espinales, vestibulares, etc.) así como de áreas auditivas y visuales, y transmiten potenciales de acción de alta frecuencia, produciendo en las células de Purkinje, a través de las fibras paralelas, frecuencias de disparo de entre 50 y 100 Hz (Rodríguez et al., 2000). Por otra parte, recibe información de las fibras trepadoras, que provienen del bulbo raquídeo, concretamente de la oliva inferior. Estas fibras conectan con las células de Purkinje a través de su árbol dendrítico, transmitiendo potenciales de acción de baja frecuencia, en torno a 1 Hz (Brodal, 1992). Por tanto, las células de Purkinje son las grandes receptoras de información de las fibras

musgosas por medio de las fibras paralelas (hasta 175.000 contactos sinápticos), y de las fibras trepadoras (con 300 contactos aproximados solo de una fibra). Además de ser receptoras de información de las fibras musgosas y las fibras trepadoras, las células de Purkinje actúan inhibiendo los núcleos profundos del cerebelo, así como los núcleos vestibulares, y son la única ruta de salida de información desde el cerebelo (Ito, 2001).

La sustancia blanca, situada debajo de la corteza, contiene tres núcleos cerebelares profundos, a saber: el núcleo medial (o fastigiado), el intermedio (o interpósito) y el lateral (o dentado) (Brodal, 2004). El núcleo medial obtiene información del vermis, y la proyecta hacia núcleos vestibulares y la formación reticular, por lo que actúa directamente sobre las neuronas motoras situadas en la médula espinal, influyendo en la regulación de componentes motores gruesos, como el tono, la postura y los reflejos dependientes de la médula espinal (García et al., 2009). Así mismo, el núcleo intermedio recibe información de la zona intermedia del cerebelo, proyectando en el núcleo rojo situado contralateralmente, influyendo directamente sobre las motoneuronas flexoras de la médula espinal, implicadas en la ejecución de la motricidad fina (López-Antúnez, 2000). En cuanto al núcleo lateral, este recibe información de los hemisferios cerebrales, y proyecta a la corteza premotora y corteza motora a través del núcleo ventrolateral del tálamo contralateral, ejerciendo influencia en la activación de órdenes motoras activadas por la corteza cerebral (Kandel et al., 2001).

1.3.1.1. ORGANIZACIÓN A NIVEL CELULAR DEL CEREBELO

Como comentamos anteriormente, la corteza cerebelosa se encuentra dividida en tres capas: capa molecular, capa intermedia o de las células de Purkinje y la capa granular.

CAPA MOLECULAR

La capa más superficial de todas es la capa molecular. En esta capa, la densidad en el número de células presentes es baja, estando los somas celulares ampliamente distribuidos, aunque se observa la presencia de una gran cantidad de axones y dendritas (Haines, y Dietrichs, 2011). En esta capa se encuentran las células estrelladas y las células

en cesto, situadas de manera que las estrelladas se encuentran de forma más superficial que las células en cesto, que se sitúan en la región más profunda, cerca de los somas de las células de Purkinje. Esta disposición se debe a que las células estrelladas y en cesto integran inputs procedentes del córtex, enviándolos directamente a las células de Purkinje (Haines, y Dietrichs, 2011). Así mismo, también encontramos en esta capa las arborizaciones de las dendritas de las células de Purkinje (en el plano ortogonal al eje longitudinal). Estos árboles dendríticos se extienden ampliamente en el plano sagital, siendo reducido en el eje transversal. (De Zeeuw et al., 1997).

Concretamente, células estrelladas y células en cesto despliegan sus axones en el plano sagital, sin embargo, las células estrelladas realizan sinapsis con las dendritas más alejadas de las células de Purkinje, a diferencia de las células en cesto, que se extienden de forma lateral por encima de los somas de las células de Purkinje, ramificándose sobre estos, formando unos “cestos” que los rodean casi al completo (López-Antúnez, 2000)

En esta misma capa, se observa de igual modo las dendritas de las células de Golgi, mientras que sus somas se encuentran en la capa granular. Así mismo, en esta capa se encuentran las fibras paralelas, que se extienden en el mismo plano de la folia. Estas fibras son los axones de las células granulares, que se extienden de forma ramificada. Se pueden localizar los somas de las células granulares en la capa granular, cuyos axones suben de manera perpendicular a la superficie del cerebelo, ramificándose en la capa molecular en las dos direcciones al eje longitudinal de la folia. De este modo, cada una de las fibras paralelas se prolonga de forma perpendicular entre los huecos dejados por los árboles dendríticos de las células de Purkinje, haciendo un gran número de sinapsis en su recorrido. Mientras esto ocurre, cada célula de Purkinje recibe una enorme cantidad de sinapsis procedentes de miles de fibras paralelas (García et al., 2009).

Además de lo ya comentado, en la capa molecular también se pueden observar las fibras trepadoras, que terminan en esta capa a través de las ramificaciones que muestran las dendritas de las células de Purkinje, realizando cientos de contactos sinápticos con estas a su paso, además de llevar a cabo sinapsis colaterales a las células de Golgi, en cesto y las estrelladas. En la **Figura 4** podemos observar la arquitectura ortogonal propia de la corteza del cerebelo.

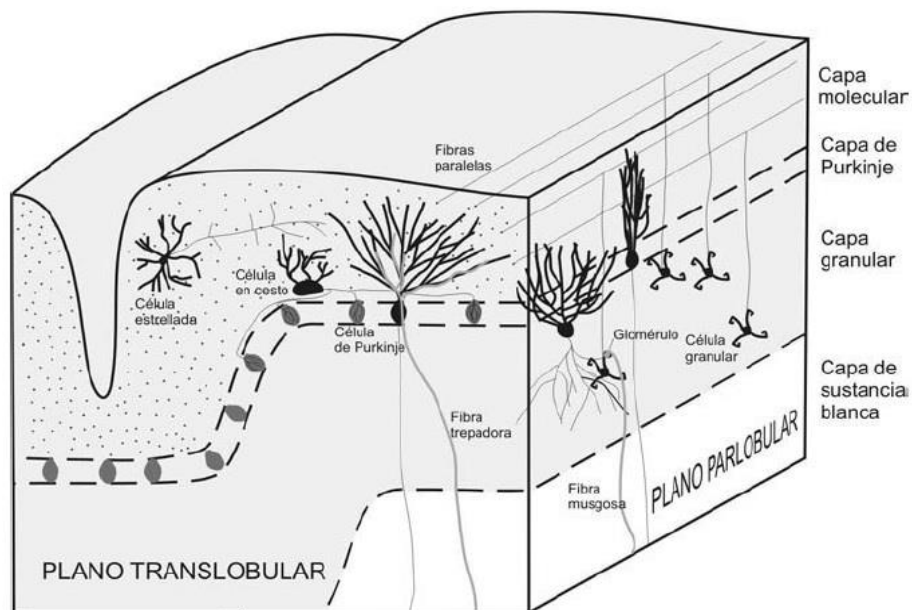


Figura 4.- Estructura ortogonal del cerebelo. Tomando como referencia el eje mayor de la folia (plano parlobular) y el eje menor (plano translobular), se puede observar que el árbol dendrítico de las células de Purkinje, las células estrelladas y las células en cesto se extienden en el eje translobular, mientras que las fibras paralelas se sitúan alineadas de forma paralela en el plano parlobular. Obtenido de Rodríguez et al. (2000).

Como se puede suponer, las células cuyos somas se encuentran en la capa molecular tienen unas características concretas. Por una parte, situándonos en la parte más inferior de la capa molecular se observa las células en cesto, cuyos árboles dendríticos se encuentran dispuestos de manera aplanada y según el eje más pequeño de la folia, por lo que se expanden de manera perpendicular a la disposición de las fibras paralelas con las que hacen sinapsis. Así mismo, las células en cesto poseen un axón muy alargado que se prolonga de forma paralela a la superficie de la folia según el eje más pequeño de esta. Estas células destacan por las ramificaciones colaterales que surgen de sus axones de forma descendente, así como por la disposición de estos envolviendo al soma de las células de Purkinje, de ahí su nombre de células en cesto. Cada una de estas células tiene la capacidad de hacer sinapsis con más de seis somas de células de Purkinje en el caso de los mamíferos (Kandel et al., 2014).

Por otra parte, en la parte más superior de la capa molecular se sitúan las células estrelladas, siendo células más pequeñas que las células en cesto. Estas células, al igual

que las células en cesto, muestran axones y árboles dendríticos que se expanden a lo largo del eje más pequeño de la folia, y sus axones terminan en la propia capa molecular, haciendo sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje. Así mismo, sus árboles dendríticos reciben aferencias excitadoras procedentes de las fibras paralelas de las células granulares (Rodríguez et al., 2000).

CAPA DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE

Justo debajo de la capa molecular se encuentran situados en línea los grandes y ovalados somas de las células de Purkinje (entre 50 y 80 μm de diámetro) (García et al., 2009), dispuestos totalmente en fila. Las dendritas de estas células se ramifican y se insertan profundamente en la capa molecular, mostrando un enorme árbol dendrítico que, al contrario de lo que ocurre con muchas otras neuronas, se extiende en un solo plano casi en su totalidad, coincidiendo con el eje más pequeño de la folia cerebelosa.

Es curioso destacar que a medida que se van ramificando las ramas de las dendritas, van mostrando más espinas dendríticas, de manera que las ramas terciarias están totalmente recubiertas (**Imagen 1**). Este detalle muestra la enorme cantidad de sinapsis que puede realizar una sola célula de Purkinje, principalmente con las fibras paralelas procedentes de las células granulares (de Solages et al., 2008)



Imagen 1.- Detalle de las espinas dendríticas de una célula de Purkinje. Se puede observar que a medida que se van ramificando en dendritas secundarias y terciarias, se van cubriendo de espinas dendríticas hasta el punto de estar totalmente cubiertas. Imagen obtenida de hdmacademy.world.

La única información eferente proveniente de la corteza del cerebelo se realiza a través del axón de las células de Purkinje, que una vez que nace del soma de la célula, atraviesa la capa granular y recorre la sustancia blanca en dirección a los núcleos profundos del cerebelo (Kandel et al, 2014). Estas sinapsis son características propias de los axones de casi todas las células de Purkinje, excepto para las que están situadas en el lóbulo floculonodular (concretamente, en el vestíbulo-cerebelo). Las células de Purkinje situadas en esta zona llevan a cabo sinapsis con los núcleos vestibulares localizados en el tronco encefálico, por lo que salen del cerebelo sin hacer sinapsis con los núcleos profundos (De Zeeuw et al., 1997).

Por último, destacar que los axones de estas células son originalmente amielínicos, pero una vez que han atravesado la sustancia blanca, se recubren de una capa de mielina (Rodríguez et al., 2000)

CAPA GRANULAR

Justo debajo de la capa de las células de Purkinje se encuentra la capa granular, siendo la capa más profunda de la corteza cerebelar. En ella se encuentran las células granulares, que son neuronas muy pequeñas y numerosas, empaquetadas densamente, junto con los grandes somas de las células de Golgi.

Las células granulares son neuronas muy pequeñas que aparecen en gran número, siendo las más numerosas de la corteza cerebelosa (de Solages et al., 2008). Estas células se caracterizan por ser de muy pequeño tamaño, con un soma bastante redondeado del que surgen entre tres y cinco dendritas cortas que terminan en forma de garra. Estas dendritas establecen sinapsis con las terminaciones de las fibras musgosas, así como con los axones de las células de Golgi, formando una estructura donde se realizan sinapsis múltiples conocida como glomérulos (Rodríguez et al., 2000).

En cuanto a los axones de estas células, ascienden atravesando la capa granular y la capa de las células de Purkinje, hasta llegar a la capa molecular, donde se dividen en dos, formando un ángulo recto con respecto al axón del que proceden. De esta manera, estas dos divisiones se sitúan de forma paralela al eje mayor de la folia, por lo que son conocidas como fibras paralelas. Así mismo, estas fibras paralelas atraviesan de forma perpendicular las enormes ramificaciones de las dendritas de las células de Purkinje, que se expanden por el plano corto de la folia cerebelosa (**Figura 4**). Es por ello que, debido al largo recorrido que realizan, las fibras paralelas establecen un gran número sinapsis excitatorias con las células de Purkinje, de manera que, aunque una fibra paralela solo establece un solo contacto con una sola célula de Purkinje, cada célula de Purkinje puede estar recibiendo información a su vez de un enorme número de fibras paralelas (Voogd y Glickstein, 1998).

Además de realizar sinapsis con las células de Purkinje, las fibras musgosas y las células de Golgi, las células granulares también ejercen contactos sinápticos con los árboles dendríticos de las células estrelladas y las células en cesta.

En cuanto a las células de Golgi (cuyos somas se localizan en las zonas más cercanas a los somas de las células de Purkinje), se caracterizan por mostrar ramificaciones tanto de las dendritas como de los axones en todas las direcciones, al contrario de lo que ocurre con el resto de células situadas en el cerebelo (Brodal, 1992).

Las dendritas de estas células se ramifican de manera principal en la capa molecular, realizando sinapsis con las fibras paralelas. En cuanto al axón, este se ramifica de manera intensa cerca del propio soma celular y extendiéndose por la capa granular también intensamente (**Figura 5**). Sus terminales axónicas ejercen contactos sinápticos en los glomérulos (inhibiendo), así como con las dendritas de las células granulares y las terminaciones de las fibras musgosas (Ito, 2001).

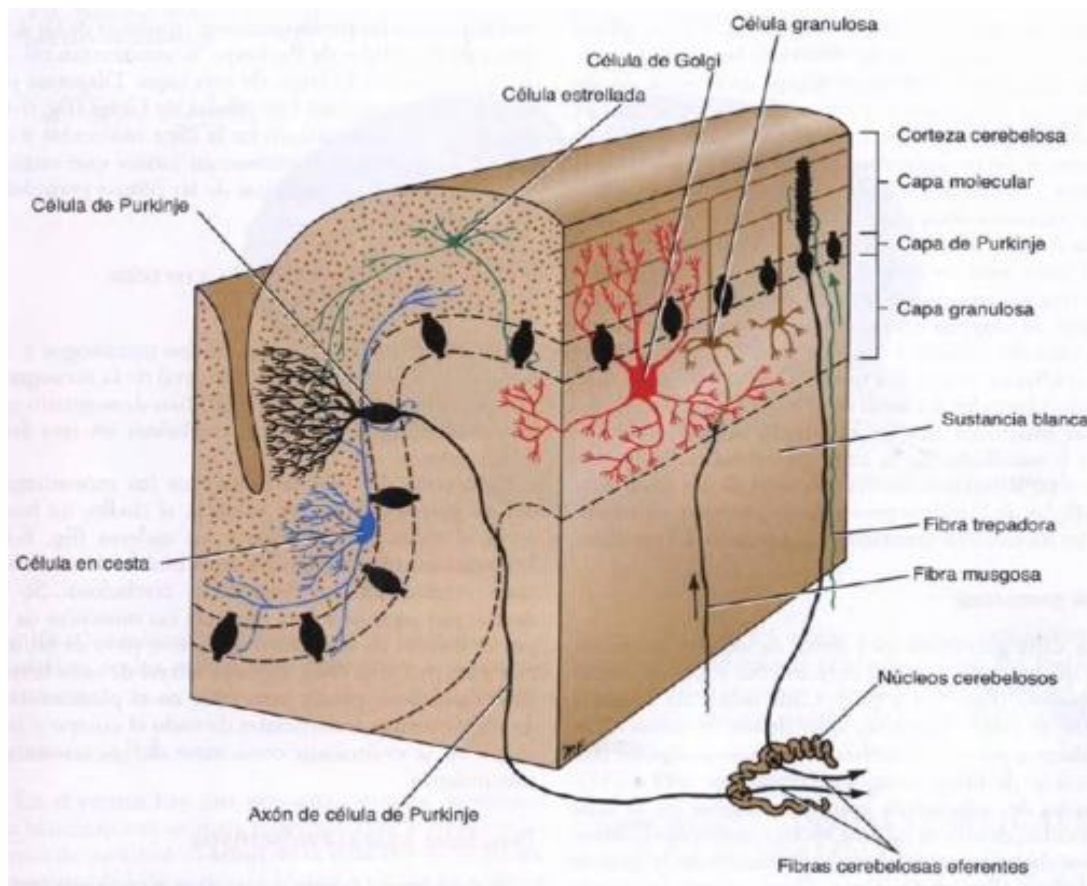


Figura 5.- Organización celular de la corteza cerebelosa. Destacamos la célula de Golgi, donde se puede apreciar el tamaño y la expansión tanto de las dendritas como de los axones. Obtenido de Snell, R.S (2009).

1.3.2. RECEPTORES DE KAINATO EN EL CEREBELO

Como se ha comentado anteriormente, los receptores de kainato (KAR) se expresan en la corteza del cerebelo (Pemberton et al., 1998; Smith et al., 1999; Spiliopoulos et al., 2009). El cerebelo participa en la modulación del movimiento modificando los patrones de actividad de las neuronas motoras. Estructuralmente, y tal y como hemos desarrollado anteriormente, el cerebelo está compuesto por la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos y presenta cinco tipos de células: las células de Purkinje, las células estrelladas, las células en cesta, las células de Golgi y las células granulares. Las células de Purkinje están alineadas una frente a la otra y sus árboles dendríticos forman dos capas bidimensionales a través de las cuales pasan las fibras paralelas de las células granulares ubicadas en la capa granular. Estas fibras paralelas establecen sinapsis excitadoras entre las células granulares y las espinas de las dendritas de las células de Purkinje, así como las fibras trepadoras (originadas en el núcleo de la oliva inferior) con las dendritas cercanas y el soma celular. Las fibras paralelas pasan ortogonalmente a través del árbol dendrítico de la neurona de Purkinje; Hasta 200,000 fibras paralelas forman una sinapsis con una sola célula de Purkinje. Cada célula de Purkinje recibe hasta 500 sinapsis por parte de las fibras paralelas, todas originadas a partir de una sola fibra. Tanto las células en cesta como las células estrelladas proporcionan una entrada inhibitoria (GABAérgica) a las células de Purkinje, con células en la sinapsis en cesta hasta el segmento inicial del axón de la célula de Purkinje, y con las células estrelladas a las dendritas (Tyrrel y Willshaw, 1992; Wadiche y Jahr, 2001).

Los KAR presinápticos participan en la plasticidad del cerebelo, de manera que en las sinapsis de las fibras paralelas con las células de Purkinje median una forma de LTD que se ve afectada por la activación pareada con las fibras trepadoras (Crépel, 2009). De estos dos tipos de fibras (fibras paralelas y fibras trepadoras) solo las fibras paralelas muestran KAR presinápticos (Crépel, 2009), de manera similar a otras regiones cerebrales como las cortezas somatosensoriales y visuales en las que las fibras que contienen y no contienen receptores de glutamato ionotrópicos presinápticos se sincronizan en la misma célula postsináptica e inducen LTD (Rodríguez-Moreno y Paulsen, 2008; Banerjee et al., 2009; Rodríguez-Moreno, Banerjee y Paulsen, 2010; Rodríguez-Moreno et al., 2011; Buchanan et al., 2012; Rodríguez-Moreno et al., 2013;

Banerjee et al., 2014). El papel exacto y el mecanismo de acción de los KAR que median la LTD en el cerebelo aún no se conoce bien y se necesita una mayor investigación.

El desarrollo adecuado del cerebelo depende de una secuencia coordinada precisa de eventos postnatales, algunos de los cuales están mediados por los receptores de glutamato. Por ejemplo, los receptores de NMDA se han implicado en la migración de células granulares (Komuro y Rakic, 1993) así como en la poda sináptica de fibras trepadoras (Rabacchi et al., 1992). Aunque recientemente se ha demostrado que los KAR están involucrados en la transmisión sináptica, poco se sabe sobre su papel en el desarrollo. Sin embargo, la expresión de subunidades del receptor de glutamato de tipo kainato en células granulares inmaduras de la capa germinal externa del cerebelo en desarrollo sugiere que los KAR también pueden tener un papel en la maduración neuronal. A lo largo del proceso de maduración del cerebelo, la cantidad, la composición y la función de los KAR varían. Inicialmente, las células granulares del cerebelo tienen una cantidad mínima de AMPAR en el período postnatal en comparación con los KAR, que son predominantes en células granulares inmaduras. Diferentes estudios han demostrado que los KAR compuestos por las subunidades GluK1, GluK2 y GluK5 predominan, y durante el período de desarrollo se observa un aumento en el número de KAR y una vez que se alcanza la etapa adulta, el número de KAR que contienen subunidades GluK1 sufre una reducción en su expresión en la capa granular, mientras que GluK2 y GluK5 permanecen constantes, en contraste con los AMPAR que aumentan su número, constituyendo una mayoría muy notable en comparación con los KAR.

Todos estos hallazgos sugieren que los KAR tienen un papel importante en el proceso de desarrollo del cerebelo. Algunas indicaciones sugieren que los KAR que contienen GluK1 participan en el desarrollo del cerebelo al comienzo de la diferenciación de las células granulares.

Además, los KARs se han visto involucrados en algunas alteraciones cerebrales en el cerebelo y existe una relación directa entre la inyección de KA y la ataxia cerebelosa. Por lo tanto, el cerebelo es un objetivo importante para estudiar las funciones de los KAR y su posible papel en el origen de la ataxia (Yamaguchi et al., 1984; Maiti et al., 1986; De

Vera et al., 2002; Andoh et al., 2008). Además, en pacientes con esquizofrenia, se observa un aumento en los KAR que contienen subunidades GluR6 y K2, lo que mediaría una reducción en la transmisión GABAérgica (Harrison et al; 1990; Bullock et al., 2008). En la neurodegeneración, los KAR pueden tener un papel en la calcificación del tejido cerebral, ya que se ha encontrado que la aplicación local de KA en algunas áreas del cerebelo produce cambios en diferentes niveles de iones, aumentando los niveles de Ca^{2+} durante más de 8 semanas, lo que media la calcificación. (Korf y Postema, 1984). Así mismo, se ha observado que los KAR producen aumentos en el calcio intracelular (Korf y Postema, 1984; Savidge et al., 1997) y parece indicar que este aumento del calcio intracelular no pone a la célula en riesgo debido a la excitotoxicidad, gracias a su baja conductancia en contraste con los AMPAR. Debido a la falta de conocimiento sobre el tema, es necesario realizar más exploraciones para determinar el papel de los KAR en el desarrollo del cerebelo y las alteraciones del cerebelo.

Se sabe que los KAR se expresan en la corteza del cerebelo en los axones de las células granulares que forman fibras paralelas y que hacen sinapsis excitadoras con las células de Purkinje (Smith, Wang y Howe., 1999). Así mismo, se han reportado las transcripciones del ARN mensajero que codifican para diferentes subunidades KAR y la expresión funcional de los subtipos KAR (Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Bahn et al., 1994; Petralia et al., 1994). Los estudios biofísicos con registros de un solo canal han demostrado la actividad de GluK1 (Swanson et al., 1996), lo que sugiere que estos KAR son permeables al Ca^{2+} . Sin embargo, las acciones moduladoras de los KAR en el cerebelo y los mecanismos intracelulares involucrados son mayoritariamente desconocidos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de los receptores de glutamato de tipo Kainato en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica en el cerebelo de ratón.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la activación de los receptores de tipo Kainato facilita la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
2. Determinar si la activación de los receptores de tipo Kainato deprime la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
3. Determinar el mecanismo de acción de los receptores de Kainato para facilitar la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.
4. Determinar el mecanismo de acción de los receptores de Kainato para deprimir la transmisión sináptica glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las células granulares y las células de Purkinje en el cerebelo de ratón.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo en rodajas de cerebelo de ratones macho C57Bl/6, de entre 30 y 45 días de edad (P30 y P45, siendo P0 el día del nacimiento, **Figura 1A, B**). Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la directiva de la Unión Europea para el uso de animales de laboratorio en experimentos agudos (609/86/EU), siendo aprobados, así mismo, por el Comité Local de Ética (Junta de Andalucía y Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España).

3.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO

Los animales se anestesiaron con Isoflurano (Marca Isoflo, **Figura 1C**), sacrificándose posteriormente por decapitación, obteniéndose el cerebro y el cerebelo a continuación (**Figura 1E**), y colocándolos en una solución “ringer” a baja temperatura (entre 0 y 4°C), siendo su composición semejante a la del líquido cefalorraquídeo (**Tabla 1**), estando esta solución constantemente oxigenada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) mediante un tubo colocado directamente en la solución.

Una vez extraído el cerebro, se fijó a la plataforma de un vibratomo Leica, modelo VT 1200s (**Figura 2A**), estando sumergidas de forma constante en la solución “ringer” fría (**Figura 2B**). Se obtuvieron rodajas sagitales de cerebelo de 350 µm de grosor, conteniendo las sinapsis de las fibras paralelas- células de Purkinje. Las rodajas se colocaron en una cámara de incubación con solución “ringer” a temperatura ambiente (entre 22 y 25°), permaneciendo en ella al menos una hora antes de su utilización y estando oxigenada en todo momento (**Figura 2C y D**).

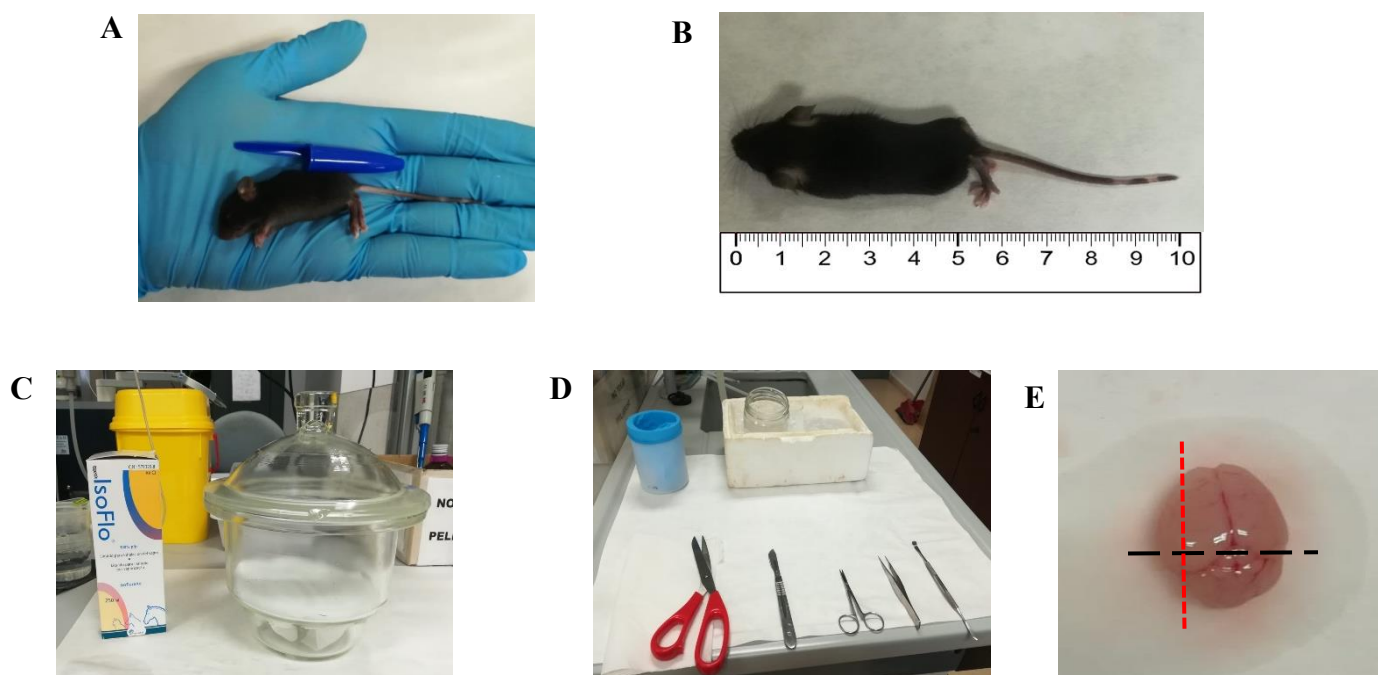


Figura 1.- Proceso de extracción del cerebro. **A:** Ratón sujeto experimental, variedad C57Bl/6 con edad P30-P45. **B:** Mismo sujeto experimental, tamaño en centímetros. **C:** Cámara utilizada para anestesiarse a los ratones. **D:** Materiales utilizados para extraer el cerebro. **E:** Cerebro extraído. Para los registros, realizados en cerebelo, se eliminó el cerebro casi en su totalidad una vez obtenidas las rodajas, cortando por la parte posterior del mismo (líneas negras discontinuas), y se obtuvieron cortes sagitales del cerebelo.

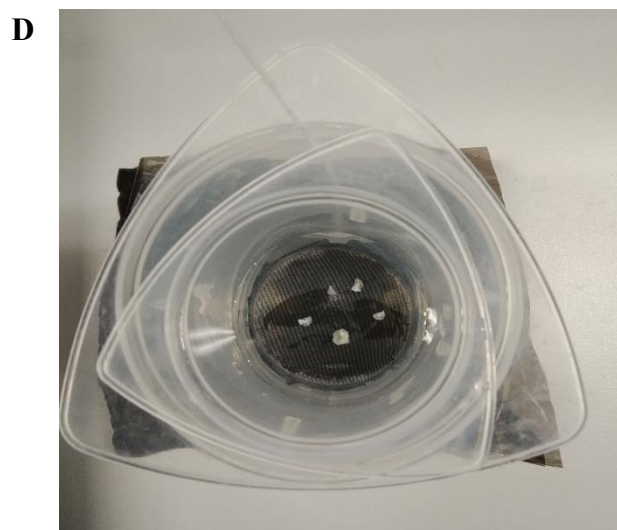
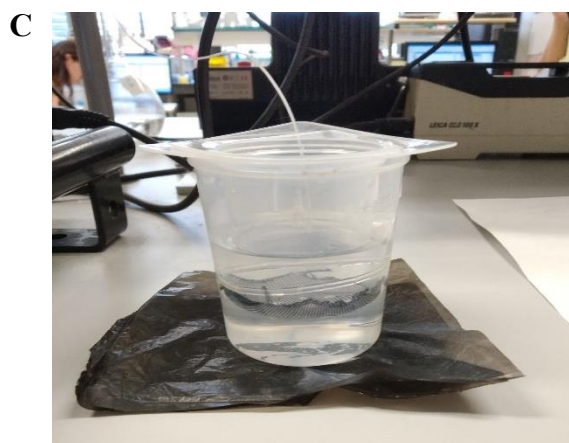
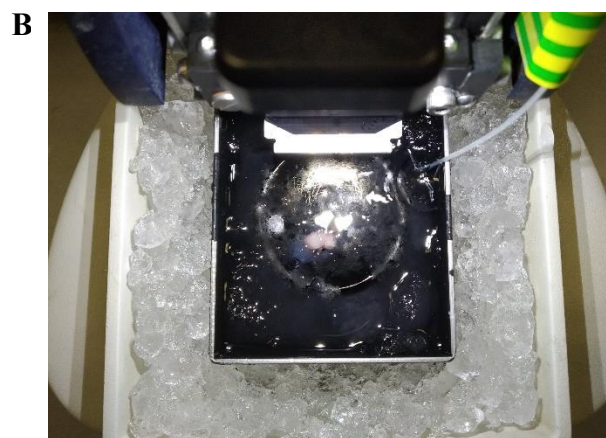
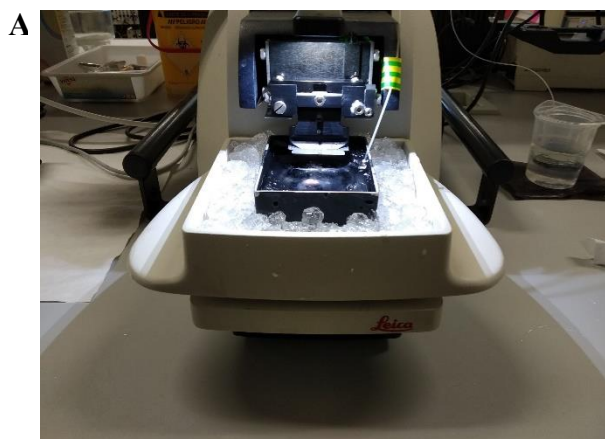


Figura 2.- Preparación de las rodajas de cerebelo. **A:** Vibratomo Leica modelo VT 1200s, utilizado para cortar las rodajas con un grosor de 350 μm . **B:** Cerebelo y parte del cerebro fijado a la plataforma metálica del vibratomo, para proceder a cortarlo en rodajas. **C:** Rodajas colocadas en una cámara con “ringer” a temperatura ambiente, estando oxigenadas de forma constante por medio de carbógeno. Se dejaron reposar 1 hora antes de proceder a su uso. **D:** Cámara vista desde arriba, donde se pueden apreciar las rodajas.

3.2. SOLUCIONES

Para la realización de los cortes cerebelares y el posterior mantenimiento de las rodajas, se utilizó una solución “ringer” (**Tabla 1**). Esta solución se preparó a partir de dos “stocks”, elaborados a diario para que la solución “ringer” fuera fresca.

Tabla 1.- Composición del “ringer” utilizado para mantener las rodajas.

STOCK 1			1x	10x
Sustancia	Peso g/mol	mM	g/l	g/l
NaCl Sodium Chloride	58.44	126.00	7.363	73.63
KCl Potassium Chloride	74.56	3	0.224	2.24
NaH ₂ PO ₄ Sodium Phosphate monobasic dihydrate	156.01	1.25	0.195	1.95
MgSO ₄ ·7H ₂ O Magnesium sulfate Heptahydrate	246.50	2.00	0.493	4.93
CaCl ₂ ·2H ₂ O Calcium Chloride dihydrate	147.00	2.00	0.294	2.94
Glucosa	180.20	10.00	1.802	18.02

STOCK 2			1x	10x
Sustancia	Peso Molecular	mM	g/l	g/l
NaHCO ₃ Sodium bicarbonate	84.01	24.00	2.016	20.162

Los experimentos se realizaron utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de whole-cell (célula completa), utilizando una solución interna con la siguiente composición (**Tabla 2**):

Tabla 2.- Composición de la solución interna estándar de CsCl (voltaje –clamp) utilizada.

SUSTANCIA	PROV./CÓDIGO	PM	mM	PESO (mg) para 20 ml
CsCl	SIGMA C-3032 25 mg	168.4	140 mM	471.52*
EGTA (Ethylene glycolbis (2-aminoethylether)-N, N,N', N'-tetraacetic acidnimum 99,5% titration)	SIGMA EA378- 25 mg	380.4	0.2 mM	1.5216
HEPES Minimun 99,5% titration (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	SIGMA H3375- 500 g	238.3	10 mM	47.66
ATP-Mg	SIGMA A-9187	507.18	2 mM	20.2872
GTP Disodium salt	SIGMA G-8877- 100 mg	523	0.3 mM	3.138
QX-314	SIGMA L-5783 50 mg	343.3	5 mM	34.33

3.3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Para la realización de los experimentos, se llevaron a cabo registros de corrientes postsinápticas excitadoras provocadas (eEPSCs).

3.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

La rodaja se mantuvo todo el tiempo en contacto con la solución extracelular o “ringer”, tanto en la cámara donde reposaban como en la cámara de registro (**Figuras 3 y 4**). En la cámara de registro, se perfundió la solución extracelular a una tasa constante en todos los experimentos de 2 ml/min. La localización de la región de registro (neuronas de Purkinje del cerebelo), se realizó mediante un microscopio Olympus, modelo BX51WI (**Figura 3**), usando un objetivo de inmersión 40X con contraste interdifereencial y filtro de infrarrojos.

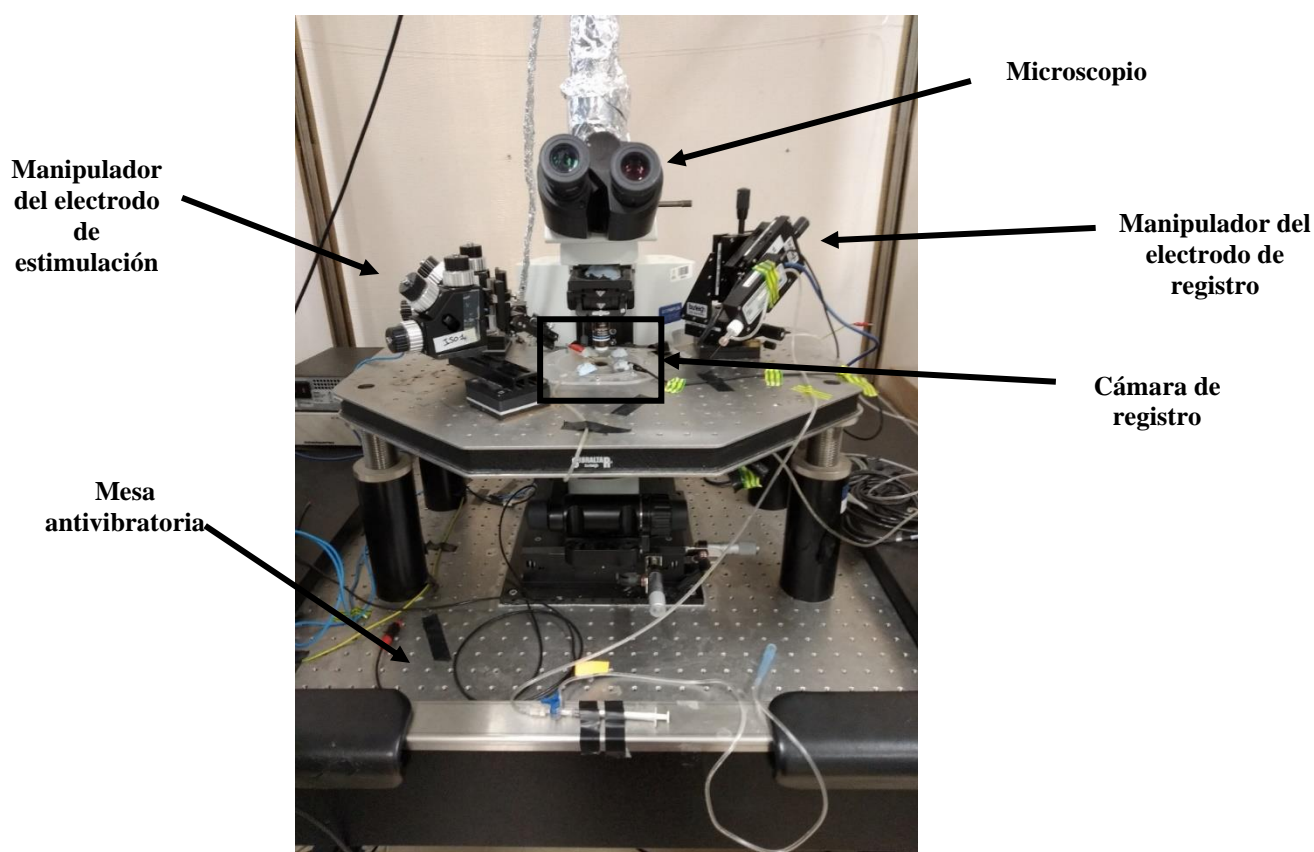


Figura 3.- Microscopio y sus elementos. Podemos observar la cámara de registro, donde se colocó la rodaja en contacto continuo con el líquido extracelular a través de una bomba de perfusión a una velocidad constante de 2 ml/min. Una vez localizadas las zonas de estimulación y registro, se colocaron los electrodos con los micromanipuladores.

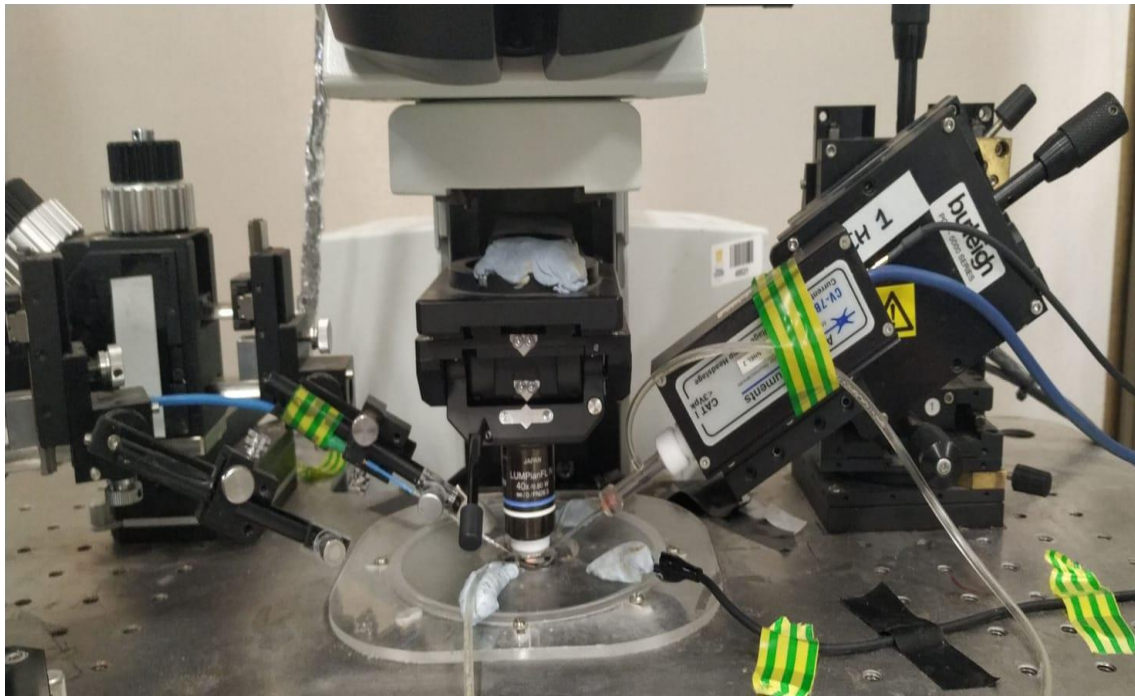


Figura 4.- Cámara de registro en detalle. Se puede observar la rodaja en contacto con el líquido extracelular, así como los electrodos de estimulación (izquierda) y de registro (derecha).

3.3.2. TÉCNICA DE REGISTRO DE CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORAS PROVOCADAS.

Se realizaron registros de corrientes postsinápticas excitadoras provocadas (eEPSCs). Para ello, se utilizó la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa o *whole cell*.

Se registraron corrientes postsinápticas excitadoras provocadas fijando el potencial de membrana (*voltaje-clamp*) a +40 mV en el caso de corrientes de tipo NMDA y a -70 mV en el caso de registro de corrientes de tipo AMPA, dependiendo del tipo de experimento realizado en cada caso.

Para provocar eEPSCs, se aplicaron pulsos eléctricos en los axones de las células granulares (que forman fibras paralelas) utilizando un electrodo de acero inoxidable monopolar ubicado en la capa molecular y utilizando un estimulador (Master-8, AMPI, Israel), a una frecuencia de 0.2 Hz (**Figuras 6 y 7**).

Para registrar las células de Purkinje elegidas, se utilizaron pipetas de vidrio de borosilicato (fabricadas mediante un *puller* o estirador de pipetas, versión P-97, Sutter Instruments) (**Figura 5**), teniendo una resistencia de 4 a 7 M Ω al llenarse de solución interna (*voltage-clamp*), y obteniendo una resistencia del sello de más de 1 G Ω . Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-25 °C).



Figura 5.- *Puller* o estirador de pipetas (versión P-97, Sutter Instruments), con el que se fabricaron las pipetas de vidrio utilizadas en los experimentos, estirando vidrio de borosilicato.

Se fijó el potencial de membrana (*voltage-clamp*) de las neuronas utilizando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Foster City, CA, USA) (**Figura 6**). La resistencia en serie fue monitorizada de forma constante, de manera que los registros y las células utilizadas se descartaron si se producían cambios de más del 15% durante los experimentos.

Los datos fueron filtrados a 2 kHz y digitalizados a 10 kHz en el ordenador utilizando el software pClamp 11.1 (Molecular Devices).

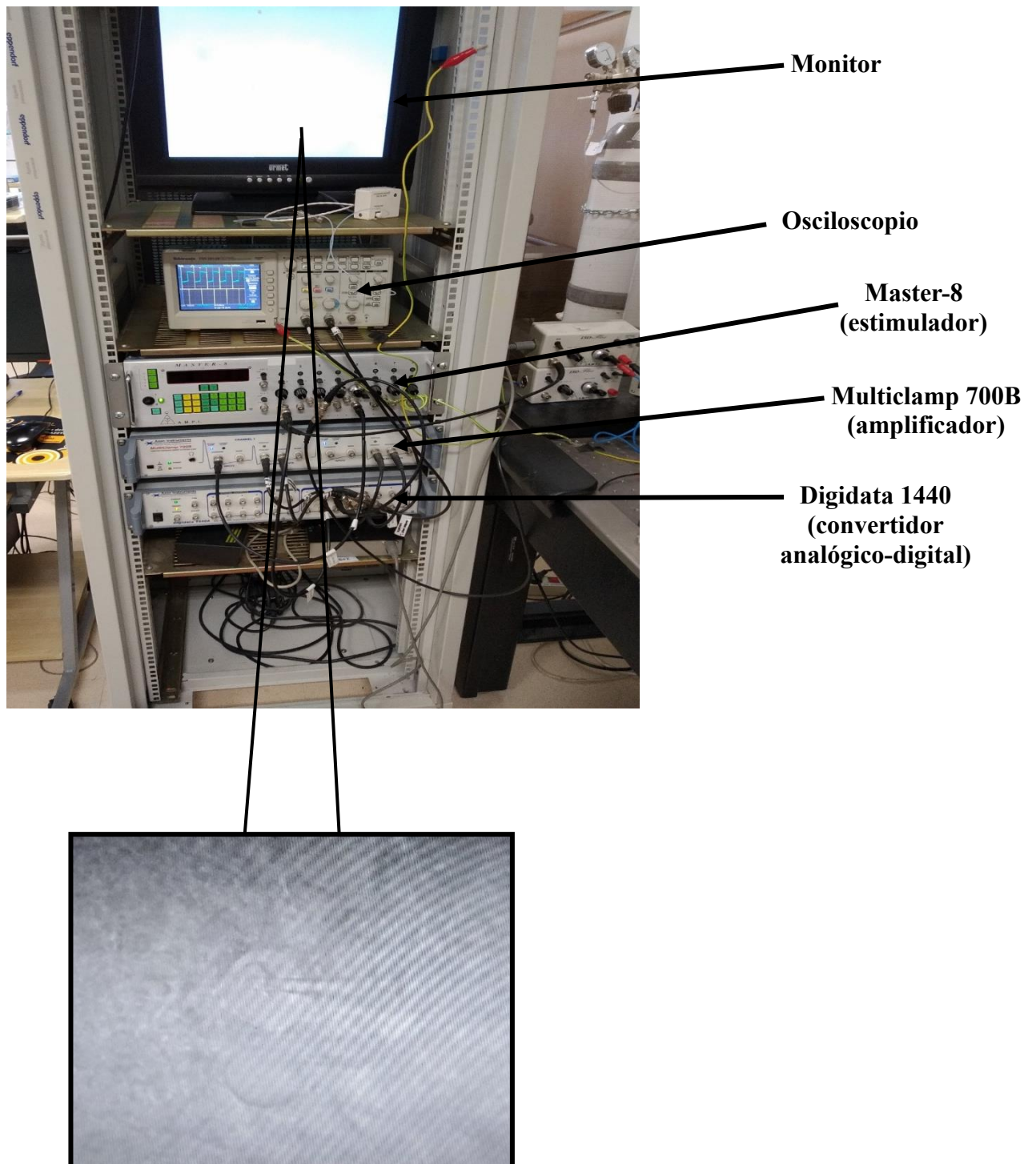


Figura 6.- Set up de electrofisiología utilizado en la realización de los experimentos. Se pueden observar los diferentes elementos utilizados para realizar los experimentos. En la imagen inferior, se observa una célula de Purkinje del cerebelo durante un experimento de *whole-cell*, de manera que se observa el electrodo de registro colocado sobre la célula.

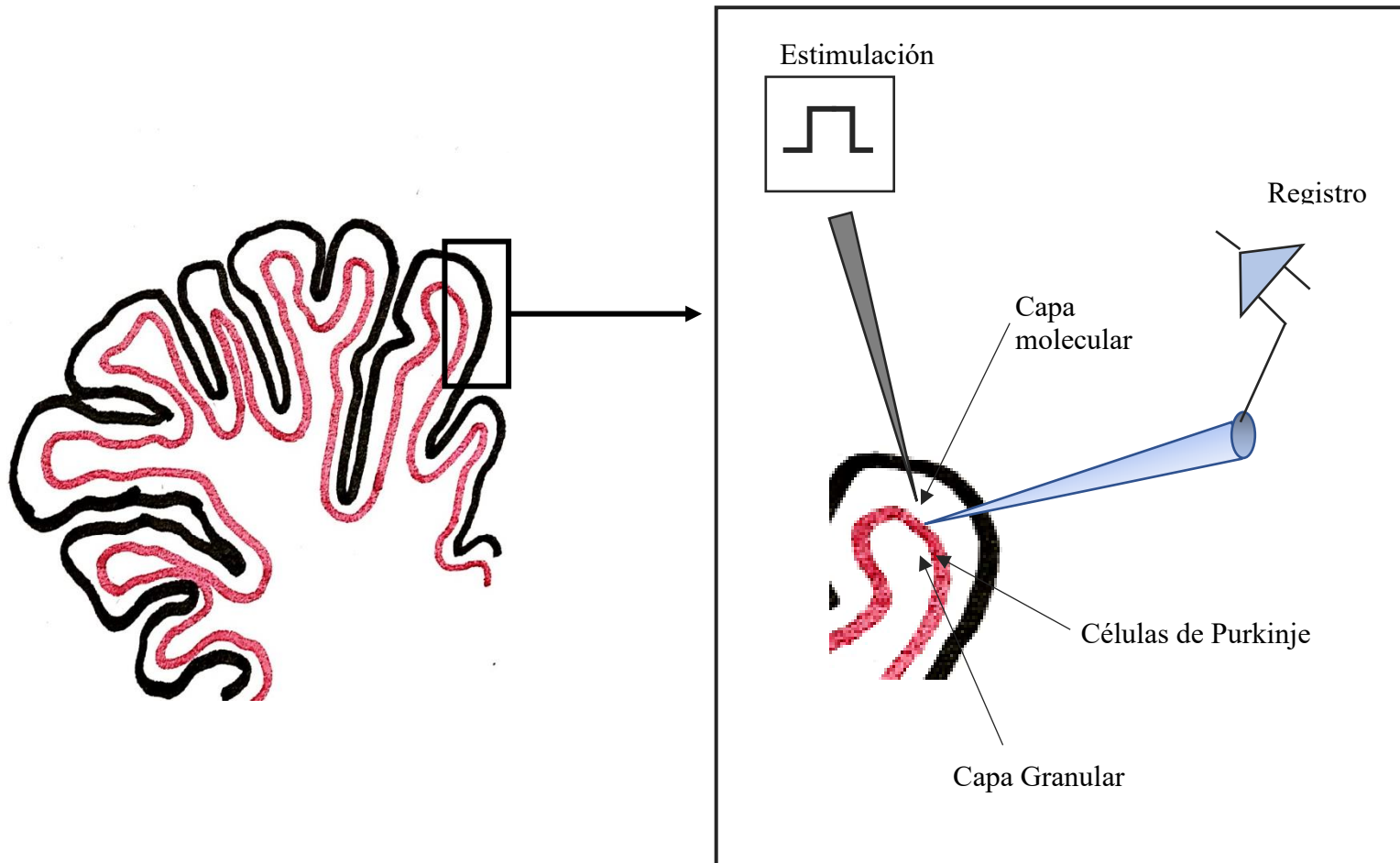


Figura 7.- Ubicación de electrodos en el cerebelo. El electrodo de estimulación se colocó sobre la capa molecular, donde se encuentran los axones de las células granulares (fibras paralelas), que hacen sinapsis con las células de Purkinje. El electrodo de registro se colocó sobre el soma de las células de Purkinje.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE MECANISMOS POSTSINÁPTICOS O PRESINÁPTICOS.

Para determinar si el mecanismo de acción de los efectos observados era postsináptico o presináptico, se realizó:

- 1) **Protocolo de estimulación por pares de pulsos**, separados entre sí 40 ms, con el objetivo de llevar a cabo un análisis de la ratio de pares de pulsos (*pair pulse ratio*, PPR), calculando el cociente de la amplitud del segundo pulso entre la amplitud total del primero. De esta forma, cambios en el PPR son indicativos de un mecanismo presináptico.
- 2) **Número de fallos sinápticos**, identificados como el número de fallos en una situación de control y tras aplicar compuestos concretos, así como la amplitud de esas respuestas.

3.4 PROTOCOLOS EMPLEADOS EN LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.

A continuación, se indican los protocolos utilizados para cada experimento realizado.

3.4.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE KAINATO (KA) SOBRE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO.

3.4.1.1. EFECTOS DE KA SOBRE LA AMPLITUD DE LAS eEPSCs.

Se aplicó el protocolo de la siguiente manera:

- Obteniendo eEPSCs durante 10 minutos de línea base, a una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz.
- Aplicación de KA a 3 μ M durante 4 minutos.

- 20 minutos de lavado de KA.

En los experimentos en los que se registraron corrientes mediadas por el receptor de tipo NMDA, se estableció el potencial de membrana a +40 mV, y se añadió a la solución GYKI53655 para bloquear a los receptores AMPA, así como bicuculina para bloquear a los receptores de GABA_A. En los experimentos en los que se registraron corrientes mediadas por el receptor AMPA, se estableció el potencial de membrana a -70 mV y se añadió DAP-5 para bloquear los receptores de NMDA.

3.4.1.2. EFECTOS DE KA SOBRE LA AMPLITUD DE LAS eEPSCs + NBQX, RP-BR-CAMP, H-89, FORSKOLIN, PHILLANTOTOXIN, RYANODINE, TAPSIGARGUIN, NIMODIPINE, PERTUSSIS TOXIN, CMZ, CALPHOSTIN-C Y W-7.

En los experimentos que incluían pertussis toxin, phillantotoxin, y forskolin, las rodajas se incubaron durante una hora en el compuesto correspondiente, permaneciendo en el baño durante toda la duración del experimento. El resto de sustancias se añadían al baño una vez que se iniciaba el experimento. Así mismo, en todos los casos, fue aplicado el siguiente protocolo:

- Registro celular durante 10 minutos de línea base, a una frecuencia de estimulación de 0.2 Hz.
- Aplicación de KA (a 3 μ M) durante 4 minutos.
- 20 minutos de lavado de KA.

En todos los experimentos realizados en este apartado, se registraron corrientes mediadas por los receptores de tipo NMDA, a un potencial de membrana de +40 mV, y añadiendo a la solución GYKI53655 (a 30 μ M) para bloquear los receptores AMPA, así como bicuculina (a 10 μ M) para bloquear los receptores de GABA_A.

3.5 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos, fueron expresados como medias \pm error estándar de la media (EEM), siendo normalizados tomando el control como el 100% de la respuesta. Las señales fueron promediadas cada 12 trazas, y los efectos de KA se midieron analizando el mayor efecto (pico de efecto) según la amplitud máxima en comparación con los puntos promediados de los 10 minutos de línea base. Se consideró significación estadística a partir de $p < 0.05$, siendo las comparaciones estadísticas realizadas utilizando la prueba t de Student para la comparación de dos conjuntos de datos, así como ANOVA para la comparación de múltiples conjuntos de datos utilizando Bonferroni como prueba post hoc.

El programa utilizado para analizar los registros fue el programa Clampfit, del paquete estadístico pClamp, v. 10.2 (Molecular Devices). Para realizar los gráficos, se utilizó el programa SigmaPlot 11.

4. RESULTADOS

4.1. PAPEL FACILITADOR DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO EN LA REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS CÉLULAS DE PURKINJE Y LAS FIBRAS PARALELAS DEL CEREBELO DE RATÓN.

4.1.1 LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO POR 3 μ M KA PRODUCE UN INCREMENTO EN LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS DE TIPO NMDA EN LA SINAPSIS FIBRAS PARALELAS-CÉLULAS DE PURKINJE.

Se ha establecido que la transmisión glutamatérgica en la sinapsis establecida entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PuC) está modulada por receptores de kainato (Delaney y Jahr, 2002), al igual que ocurre en el hipocampo (Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007 a, b, 2013).

Para determinar el papel de los KAR en la sinapsis PF-PuC en rodajas de cerebelo de ratón se estimularon los axones de las fibras paralelas mientras se medían las corrientes postsinápticas evocadas mediadas por el receptor NMDA en células de Purkinje, y se obtuvieron registros utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula completa, con el potencial de membrana fijado a +40 mV. Los registros fueron obtenidos en presencia de 30 μ M de GYKI53655, con el objetivo de bloquear la activación de los receptores de AMPA, así como en presencia de 10 μ M de bicuculline para antagonizar los receptores de GABA_A.

En estos experimentos, las sinapsis cerebelares de los ratones jóvenes adultos presentan una facilitación transitoria de las amplitudes de las corrientes postsinápticas excitadoras mediadas por el receptor NMDA al aplicar 3 μ M de KA ($138 \pm 11\%$, n=10, **Figura 1**) seguida de una depresión de la misma (el efecto inhibitor que se observa tras el efecto facilitador será descrito en posteriores apartados, estos apartados se centrarán y se compararán con el efecto facilitador que se observa dentro del círculo, **Figura 1**).

Así mismo, este efecto facilitador se observa también a una dosis de 0.3 μM y 1 μM , aunque se observa un efecto menor a dichas concentraciones ($115 \pm 2\%$, $n=6$, $117 \pm 6\%$, $n=6$, respectivamente, **Figura 1B**).

Por ello, para determinar el mecanismo de la facilitación de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR, se utilizó una dosis de KA a 3 μM en todos los experimentos, ya que esta dosis produce el máximo nivel de facilitación observable (**Figuras 1B**).

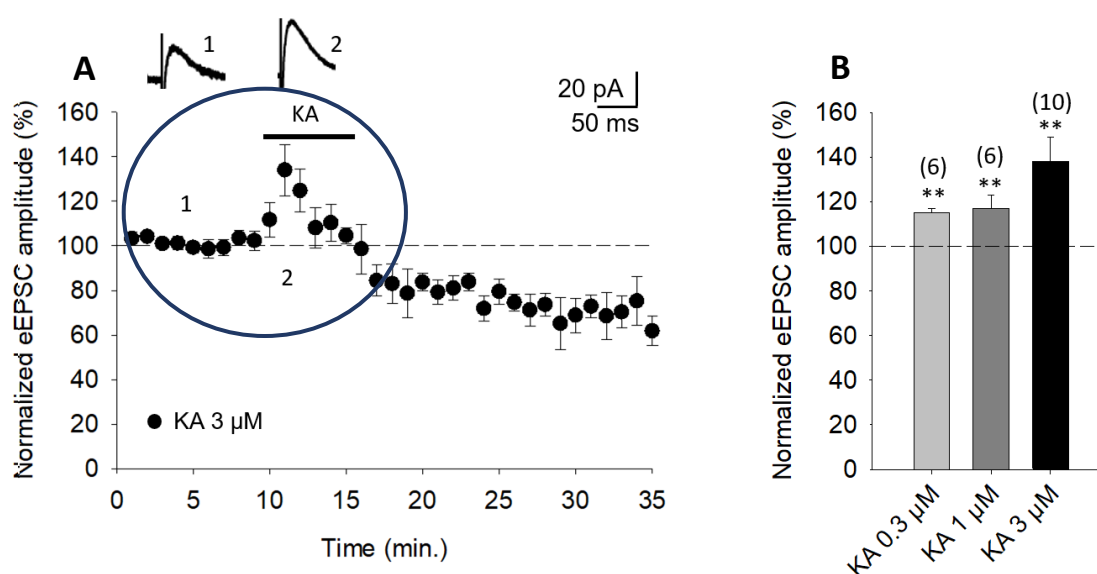


Figura 1.- (A) Curso temporal del efecto de kainato (KA) 3 μM . Como se puede observar, KA incrementa la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas en la sinapsis fibras paralelas- células de Purkinje (PF-PuC) en el cerebelo. La parte superior de la figura muestra trazos de antes y durante la perfusión de KA. **(B)** Cuantificación de la modulación a diferentes dosis (0.3 μM , 1 μM y 3 μM). Se observa que existe un mayor efecto al utilizar una dosis de 3 μM . El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Para determinar si el efecto de KA registrado en las neuronas de Purkinje en rodajas está mediado por la activación de KARs, al igual que se ha observado en otras regiones cerebrales como el hipocampo o el córtex (Lauri et al., 2001a,b, 2003; Schmitz et al., 2001; Ji and Stäubli, 2002; Contractor et al., 2003; Breustedt and Schmitz, 2004;

Rodríguez-Moreno y Sihra, 2004, 2013; Campbell et al., 2007; Pinheiro et al., 2007; Scott et al., 2008; Fernandes et al., 2009; Jouhanneau et al., 2011; Andrade-Talavera et al., 2013), se realizaron experimentos en presencia de NBQX, un potente antagonista de receptores AMPA y KA (en estos experimentos al estar los receptores de AMPA ya bloqueados por GYKI, NBQX se utiliza como antagonista de los receptores de kainato) y se observó que el efecto de facilitación de KA a 3 μ M sobre la amplitud de las eEPSC se bloqueó en presencia de 10 μ M NBQX ($95 \pm 4\%$, $n = 6$, **Figura 2**).

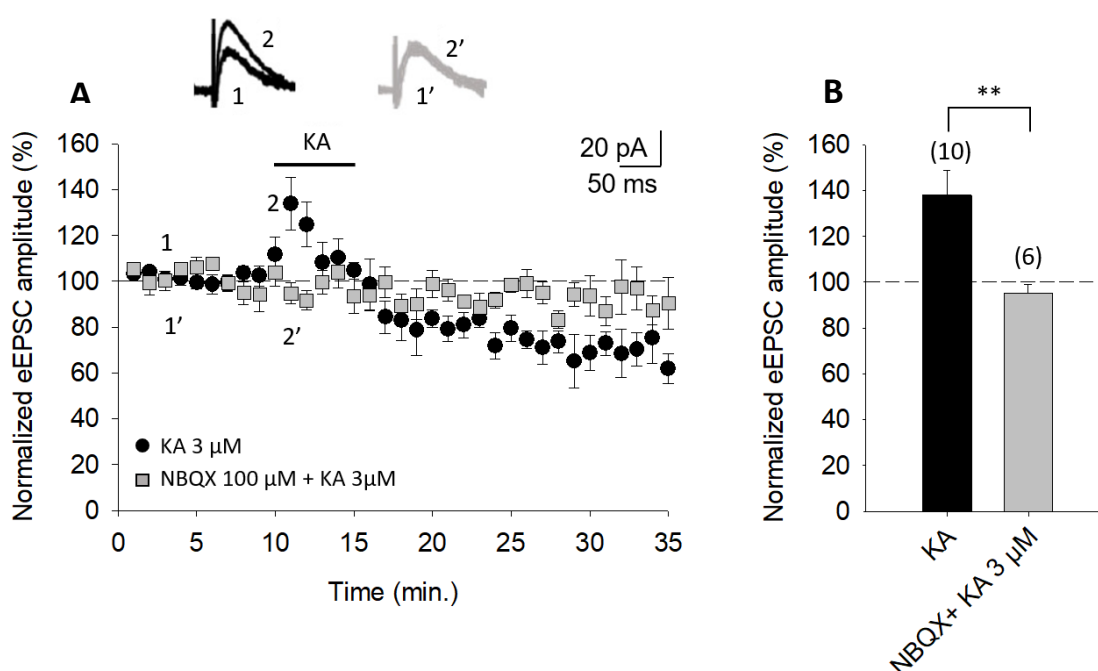


Figura 2.- (A) Curso temporal del efecto de KA 3 μ M sobre la amplitud de las eEPSCs en ausencia y en presencia de NBQX (círculos y cuadrados, respectivamente). La parte superior de la figura muestra trazos de antes y durante la perfusión de KA en ausencia (1, 2) y en presencia de 10 μ M NBQX (1', 2'). **(B)** Cuantificación de datos de A. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Como se ha indicado, en estos experimentos, dado que los receptores de AMPA fueron antagonizados en presencia del antagonista selectivo GYKI53655 en el baño, el

hecho de que al añadir NBQX prevenga el efecto de KA indica que el efecto observado se debe a la activación de KAR.

Para determinar si la facilitación observada de las corrientes de NMDA por activación de los KARs involucra un locus pre- o postsináptico se realizaron varias aproximaciones. En primer lugar, se aplicaron protocolos de estimulación por pares de pulsos y se llevó a cabo análisis de la ratio de los pares de pulsos (PPR); se observó una depresión de la PPR a un intervalo entre pulsos de 40 ms. La PPR fue de 1.9 ± 0.4 ($n = 9$) en condiciones control (línea base). Tras el tratamiento con KA, PPR disminuyó a 0.7 ± 0.3 ($n=9$; **Figura 4**), lo que es indicativo de un aumento en la probabilidad de liberación de glutamato y un locus de acción presináptico para kainato (Manabe et al., 1993).

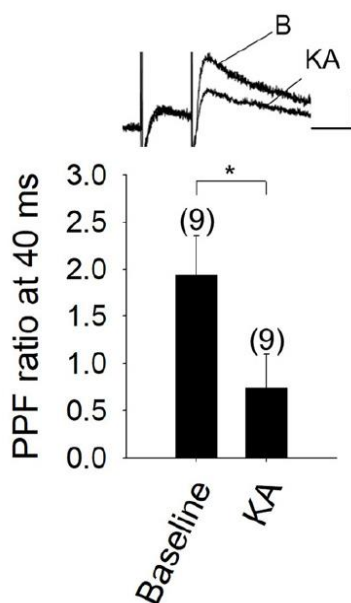


Figura 3.- La perfusión de KA 3 μ M produce una disminución en los PPR. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^* < 0.05$, test t de Student).

En segundo lugar, se determinó la proporción de fallos sinápticos en presencia de KA. En condiciones control, el porcentaje de fallos sinápticos fue $19 \pm 4\%$ ($n = 5$). En cambio, tras la aplicación de KA, el porcentaje disminuyó considerablemente ($7 \pm 3\%$, $n = 5$, **Figura 4**), indicando, de nuevo, un locus de acción presináptico.

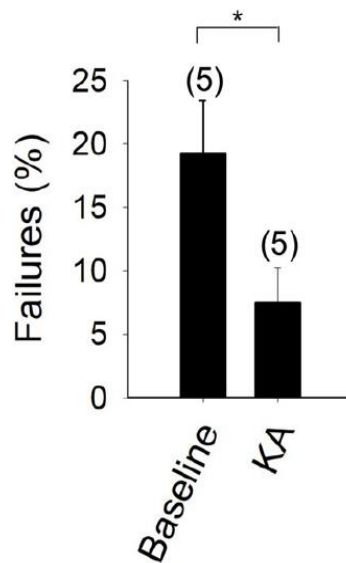


Figura 4.- Efecto de KA sobre el número de fallos en las corrientes mediadas por el receptor NMDA. Se puede observar que tras la aplicación de KA, el número de fallos sinápticos disminuye significativamente. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^* < 0.05$, test t de Student).

Seguidamente, se comparó la modulación de las corrientes excitadoras de tipo NMDA (con GYKI53655 presente) mediada por KA y las corrientes mediadas por los receptores de AMPA, registradas a -70 mV (sin GYKI53655, pero con D-AP5 y bicuculline, para bloquear los receptores de tipo NMDA y GABA_A respectivamente). KA produce un incremento similar en las eEPSCs mediadas por la activación de receptores de tipo NMDA ($135 \pm 7\%$, $n = 6$) y de receptores de tipo AMPA ($130 \pm 12\%$, $n = 5$) (**Figura 5**).

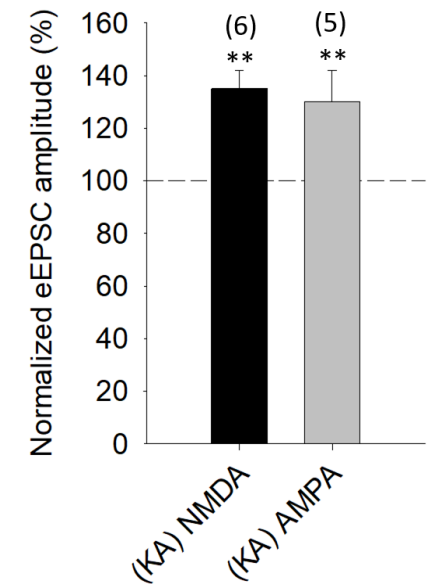


Figura 5.- Efecto de KA 3 μ M sobre las corrientes mediadas por los receptores de tipo NMDA y AMPA, respectivamente. Se puede observar que el efecto del kainato en estas corrientes es prácticamente idéntico. El número de rodajas utilizadas (de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Este aumento de las amplitudes de las eEPSCs mediados por los receptores de tipo NMDA y AMPA sugiere también que KA actúa de forma presináptica en la sinapsis PF-PuC.

4.1.2. LA FACILITACIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR LA ACTIVACION DE KAR EN LA SINAPSIS PF-PuC REQUIERE DE SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE cAMP y PKA.

Una vez verificada la acción específica de KA, en posteriores experimentos se examinó si un sistema de segundos mensajeros media la facilitación de las eEPSCs. En primer lugar, se comprobó si la proteína quinada A (PKA) está involucrada en el incremento de las eEPSCs, bloqueando la activación de la PKA mediada por cAMP, exponiendo las rodajas respectivamente a los inhibidores cAMP-Rp y H-89.

Al incubar durante una hora en 100 μ M de cAMP-Rp ó de 2 μ M H-89, la facilitación de la amplitud de las eEPSCs producida por KA 3 μ M se previno ($88 \pm 3\%$, $n=7$ tras cAMP-Rp, **Figura 6**; y $92 \pm 6\%$, $n = 7$, tras H-89, **Figura 7**; en comparación a KA 3 μ M en rodajas control, $131 \pm 9\%$, $n = 13$).

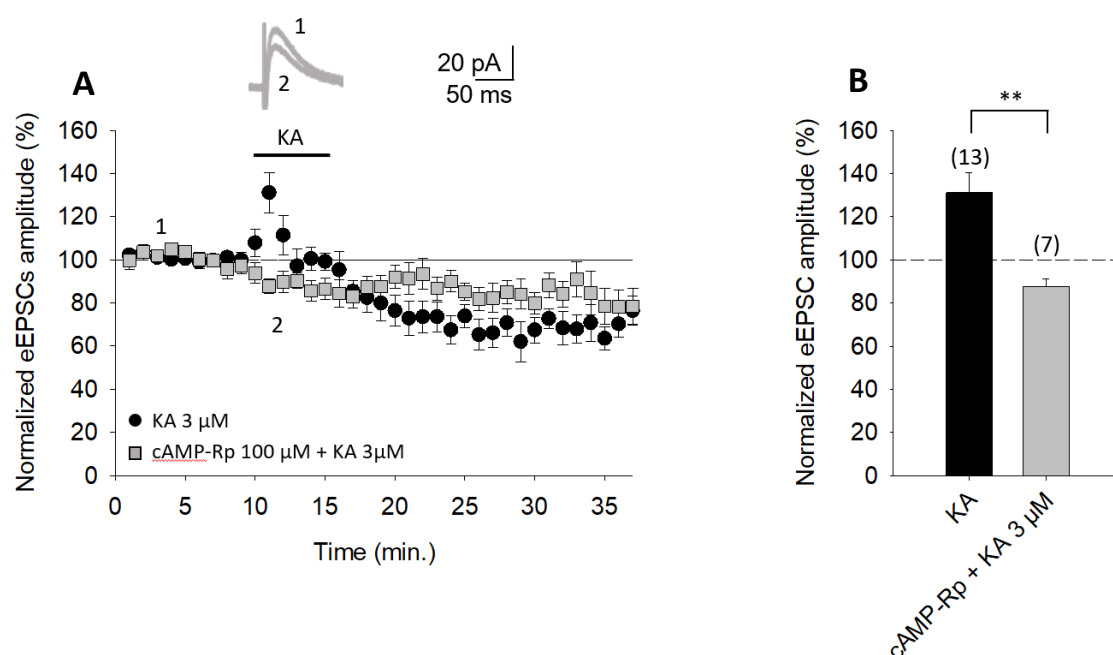


Figura 6.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas con trol y rodajas tratadas con cAMP-Rp (100 μ M). En la figura aparecen trazas representativas que muestran que KA (3 μ M) no aumenta la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con cAMP-Rp. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A), donde se puede observar que KA 3 μ M no aumenta la amplitud de las eEPSCs tras el tratamiento con cAMP-Rp, si no que la disminuye ligeramente. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro

ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

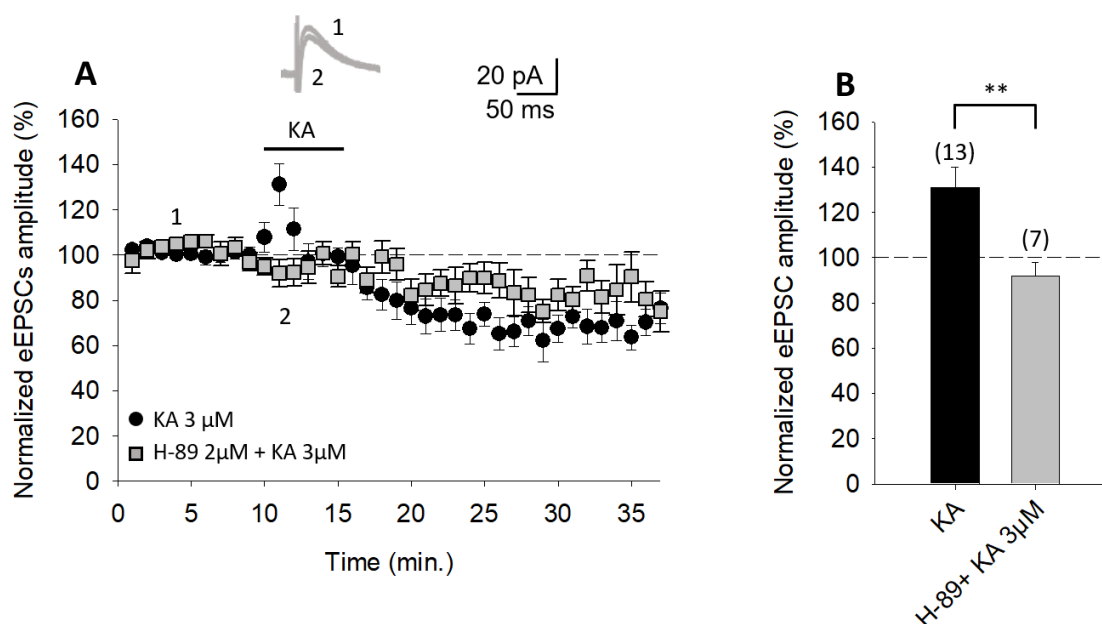


Figura 7.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con H-89 (2 μ M). En la figura aparecen trazas representativas que muestran que KA (3 μ M) no aumenta la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con H-89. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A), donde se puede observar que KA 3 μ M no aumenta la amplitud de las eEPSCs en presencia de H-89. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

Estos resultados indican que para que KA produzca un aumento de la amplitud de las EPSCs, requiere de la activación de la PKA en la transmisión glutamatérgica cerebelosa de la sinapsis PF-PuC.

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de KA, se examinó la facilitación de las eEPSCs mediadas por KA en presencia de la activación directa de adenilato ciclasa (AC) por medio de forskolin. Dado que forskolin produce efectos a largo

plazo (Tong et al., 1996), las rodajas fueron preincubadas durante una hora con este fármaco. La aplicación de KA en rodajas tratadas con forskolin (30 μ M) no alteró las amplitudes de las eEPSCs ($95 \pm 4\%$, $n = 6$; en comparación con KA 3 μ M en rodajas control, $131 \pm 9\%$, $n=13$, **Figura 8**). Estos resultados muestran que la activación previa de AC a través de forskolin impide la regulación mediada por KAR en la sinapsis PC-PuC.

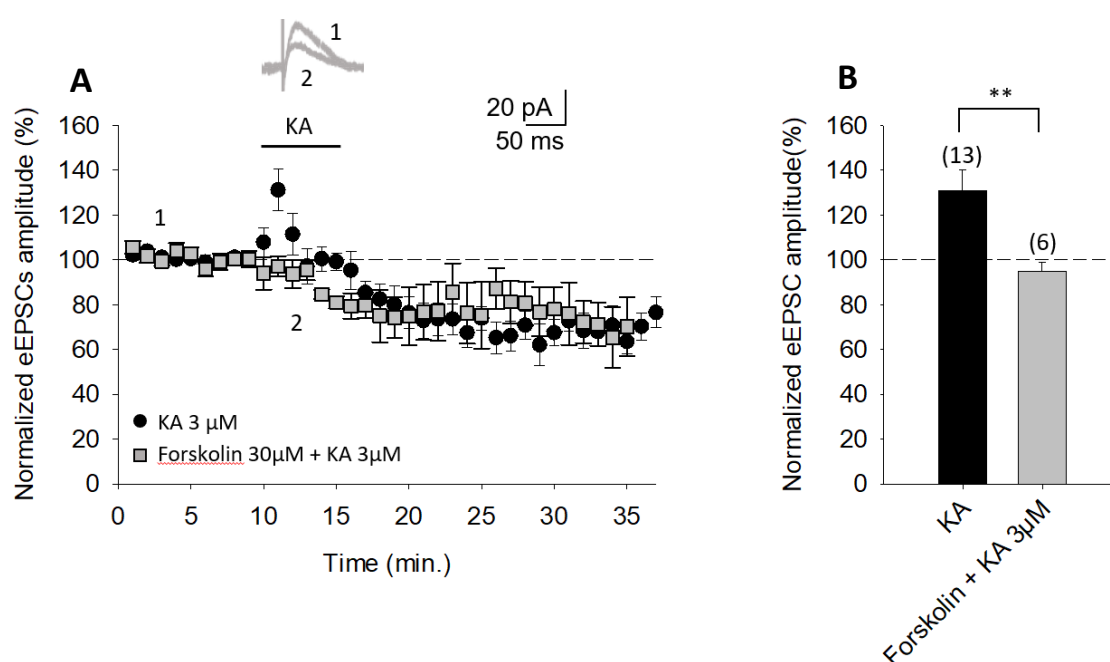


Figura 8.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con forskolin (30 μ M). En la figura aparecen trazas representativas que muestran que KA (3 μ M) no aumenta la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con forskolin. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A), donde se puede observar que KA 3 μ M no aumenta la amplitud de las eEPSCs tras el tratamiento con forskolin. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

Los resultados mostrados en las **figuras 6, 7 y 8** indican que la facilitación de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC cerebelar requiere

de una vía de señalización AC/cAMP/PKA. Sin embargo, dado que en otros experimentos, la proteína quinasa C (PKC) se ha visto también implicada en aspectos de la modulación mediada por KAR (para revisión ver Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007 a,b), se examinó si esta quinasa juega algún rol en la modulación de la sinapsis PF-PuC por KA. Para ello, se utilizó calphostin C (1 μ M) para inhibir específicamente la PKC. Los resultados obtenidos mostraron que no hay efectos significativos en la facilitación de la transmisión mediada por KA ($131 \pm 5\%$, $n = 6$; en comparación a KA 3 μ M en rodajas control no tratadas, $131 \pm 9\%$, $n=13$, **Figura 9**), indicando que la PKC no está implicada en la modulación observada.

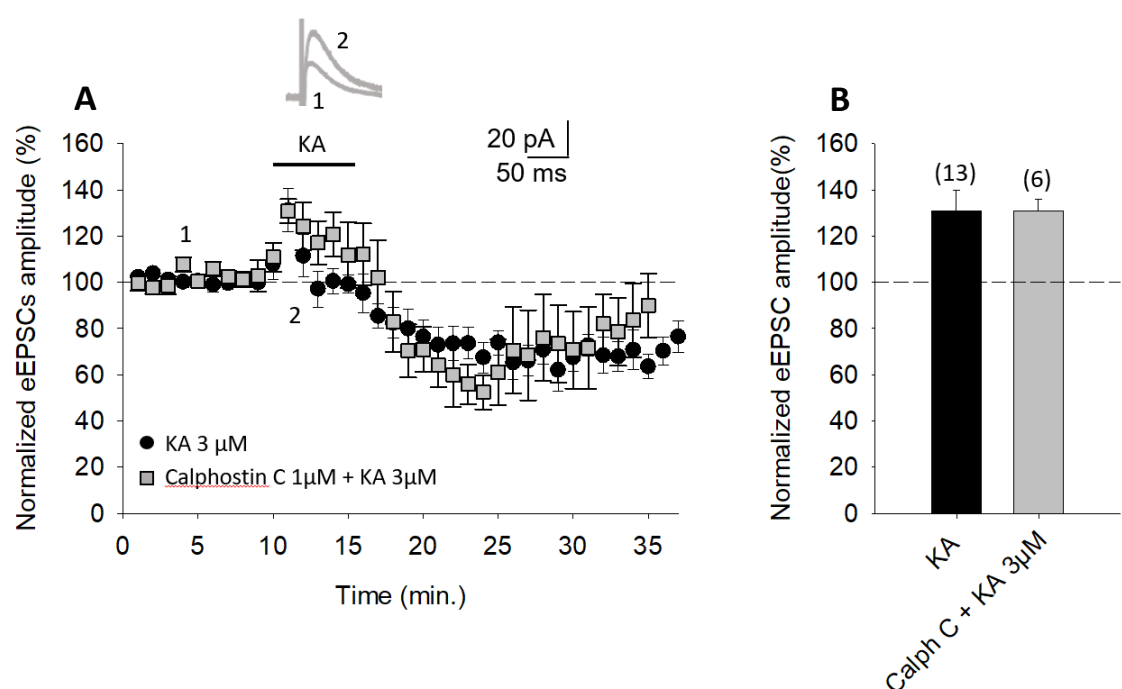


Figura 9.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con calphostin C (1 μ M). En la figura aparecen trazas representativas que muestran que KA 3 μ M sí aumenta la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con calphostin C, indicando por tanto que la activación de la PKC no impide la acción facilitadora de KA en la sinapsis PC-PuC. (B) Cuantificación de la modulación observada en (A), donde se puede observar que KA 3 μ M aumenta la amplitud de las eEPSCs a pesar del tratamiento con calphostin C. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM. ANOVA test.

Seguidamente, se determinó si el efecto de la activación de KAR presinápticos involucra la activación de proteína G. Para ello, se examinó el efecto de KA en rodajas tratadas con Pertussis toxin (PTx, 5 μ g/ml). En presencia de PTx, la facilitación mediada por KAR se mantuvo y no se vio afectada por el bloqueo de la proteína G ($122 \pm 6\%$, $n = 6$; en comparación con el efecto de KA en rodajas control no tratadas con PTx, $131 \pm 9\%$, $n = 13$, **Figura 10**).

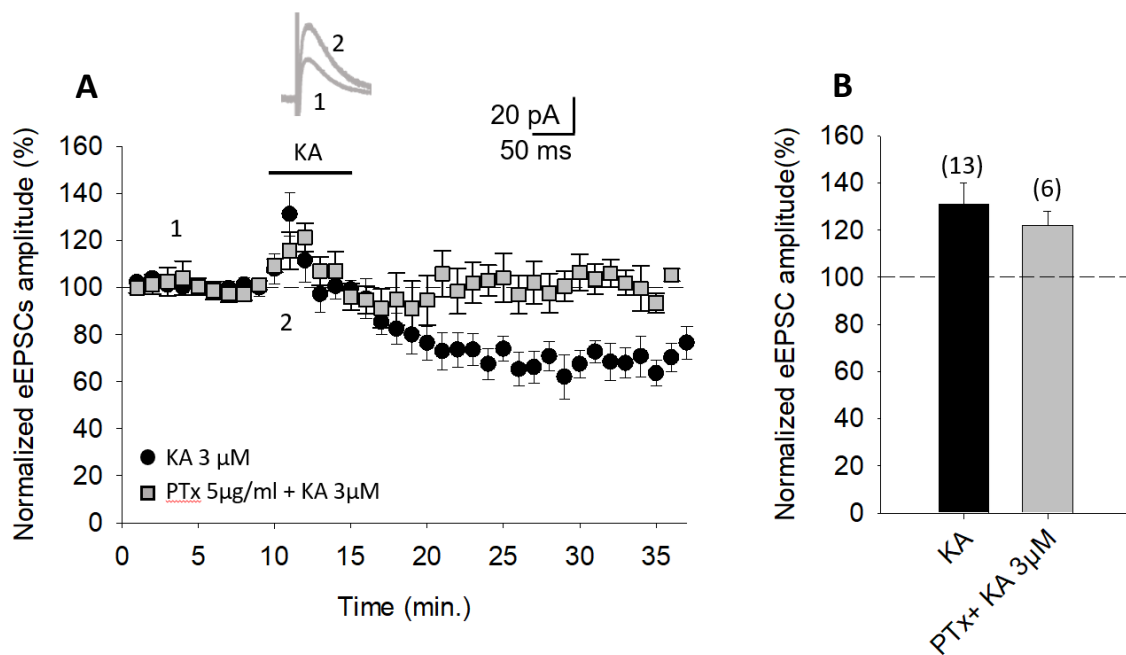


Figura 10.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con PTx (5 μ g/ml). En la figura aparecen trazas representativas que muestran que el KA (3 μ M) aumenta la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con PTx, indicando por tanto que la proteína G no está implicada en la facilitación de la transmisión sináptica mediada por KAR en la sinapsis PC-PuC. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM. ANOVA test.

4.1.3. LA FACILITACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS PF-PuC ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLES A Ca^{2+} .

El papel del Ca^{2+} en la mediación de la facilitación sináptica mediada por KAR ha sido sujeto de debate y controversia en zonas como las sinapsis de las fibras musgosas del hipocampo y CA3 (MF-CA3). Algunos estudios sugieren que la permeación de Ca^{2+} a través de KARs y la subsiguiente liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares inducido por Ca^{2+} es necesario para la plasticidad de corta y larga duración en la sinapsis MF-CA3 (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Otros estudios no han registrado efectos de KA en el Ca^{2+} citosólico (Kamiya et al., 2002), y otros, sin embargo, defienden que una disminución de la concentración de Ca^{2+} sustenta la modulación debida a la activación de KAR (Kamiya and Ozawa, 1998, 2000). Para determinar el papel del calcio en la facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de KARs presinápticos en estas sinapsis cerebelosas, se investigó el efecto de KA en las amplitudes de las eEPSCs en presencia de philantotoxin, una toxina que bloquea KARs permeables a Ca^{2+} (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008).

Tras tratar a las rodajas con philantotoxin a 3 μM , la facilitación sináptica mediada por KA 3 μM fue completamente prevenida (al $75 \pm 5\%$, $n = 7$; en comparación a KA 3 μM control, $147 \pm 17\%$, $n = 6$, **Figura 11**). Estos resultados evidencian que se requieren KAR permeables a Ca^{2+} para la facilitación sináptica observada en la sinapsis PF-PuC.

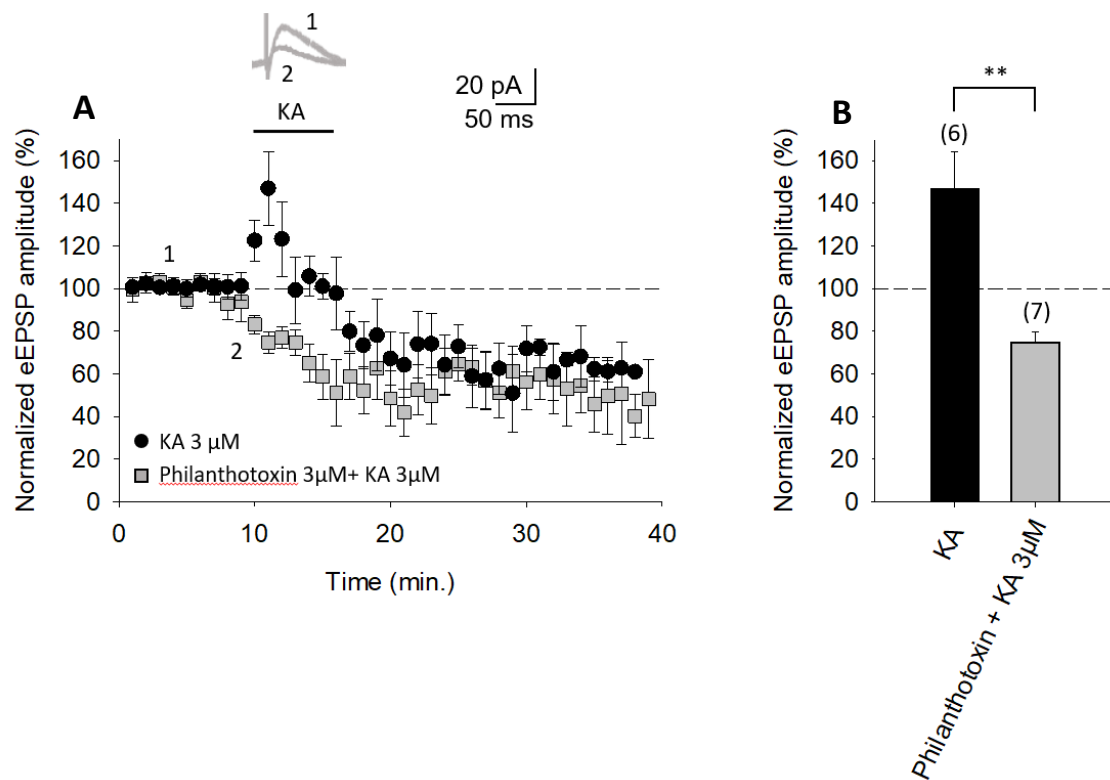


Figura 11.- La facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de KAR requiere un incremento de Ca^{2+} citosólico en la sinapsis PF-PuC. **(A)** Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control rodajas tratadas con philanthotoxin (3 μ M). **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Así mismo, se bloquearon los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo utilizando nimodipine. El tratamiento con nimodipone eliminó el efecto facilitador de KA ($87 \pm 4\%$, $n=6$ con nimodipine, en comparación al efecto de KA 3 μ M en rodajas control no tratadas, $138 \pm 11\%$, $n = 10$, **Figura 12**).

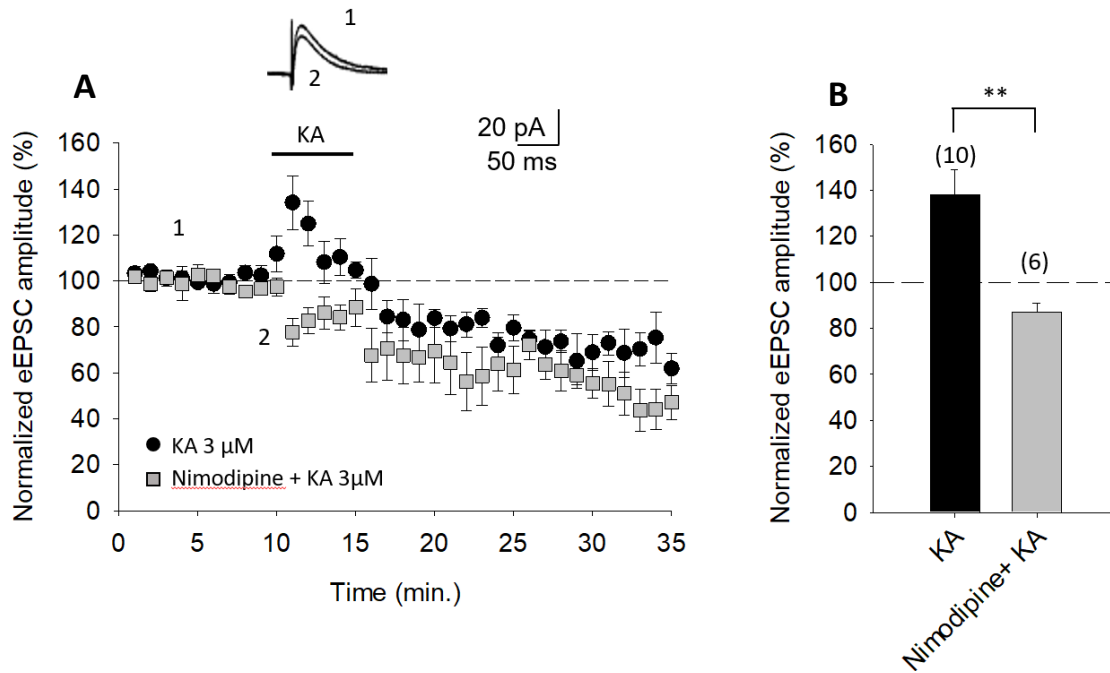


Figura 12.- La facilitación de la liberación de glutamato mediada por la activación de KAR requiere un incremento de Ca^{2+} citosólico en la sinapsis PF-PuC. **(A)** Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con nimodipine. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

A continuación, para establecer si la señal de Ca^{2+} producida por la activación de KAR requirió amplificación a través de Ca^{2+} intracelular inducido por la movilización de Ca^{2+} almacenado en reservas internas, se examinó el efecto de KA tras el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} intracelulares, utilizando thapsigargin para inhibir la bomba SERCA (bomba de calcio de retículo sarcoplásmico) responsable de la acumulación de Ca^{2+} en las reservas. El tratamiento con thapsigargin 2 μ M eliminó el efecto facilitador de 3 μ M KA y, de hecho, produjo más bien una depresión en la respuesta ($77 \pm 5\%$, $n = 6$ con thapsigargin vs $138 \pm 13\%$ en rodajas no tratadas, $n = 8$, **Figura 13**).

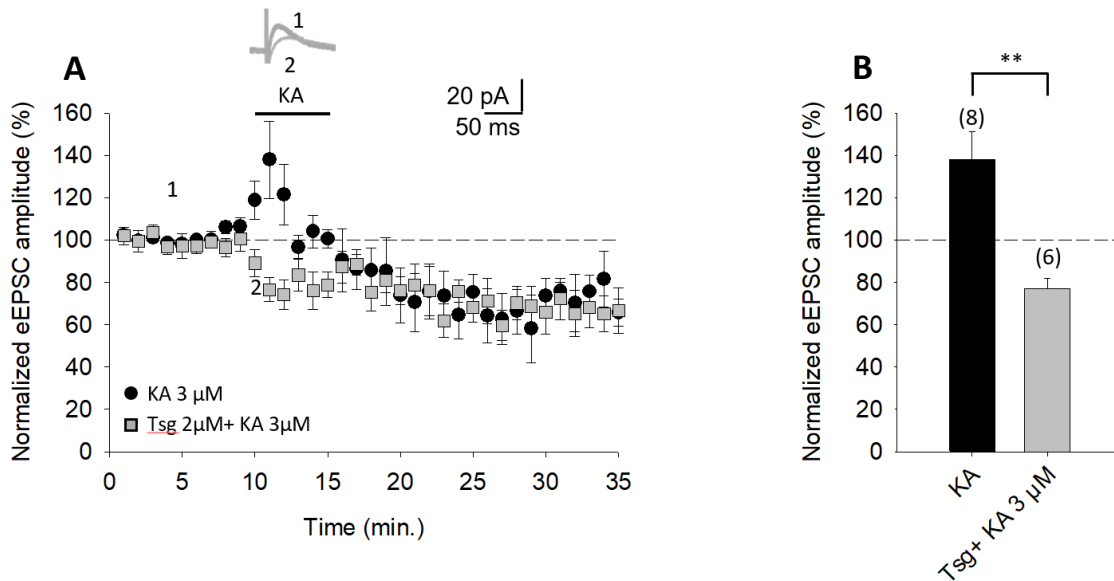


Figura 13.- (A) La facilitación de la liberación de glutamato mediado por la activación de KAR requiere un incremento del Ca^{2+} citosólico en la sinapsis PF-PuC. (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con thapsigargin (2 μ M). (B) Cuantificación de la modulación observada en (A). En las rodajas tratadas con este fármaco, el incremento de las amplitudes de las eEPSCs inducidas por KA se previno. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

También se examinó el efecto que ejerce ryanodine, que inhibe de forma selectiva la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Berridge, 1998), con el objetivo de dilucidar si esto sustenta la facilitación mediada por KAR. El tratamiento con ryanodine (10 μ M) elimina la facilitación de la transmisión mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC ($82 \pm 4\%$, $n=7$; en comparación a rodajas no tratadas, $138 \pm 13\%$, $n = 8$, **Figura 14**).

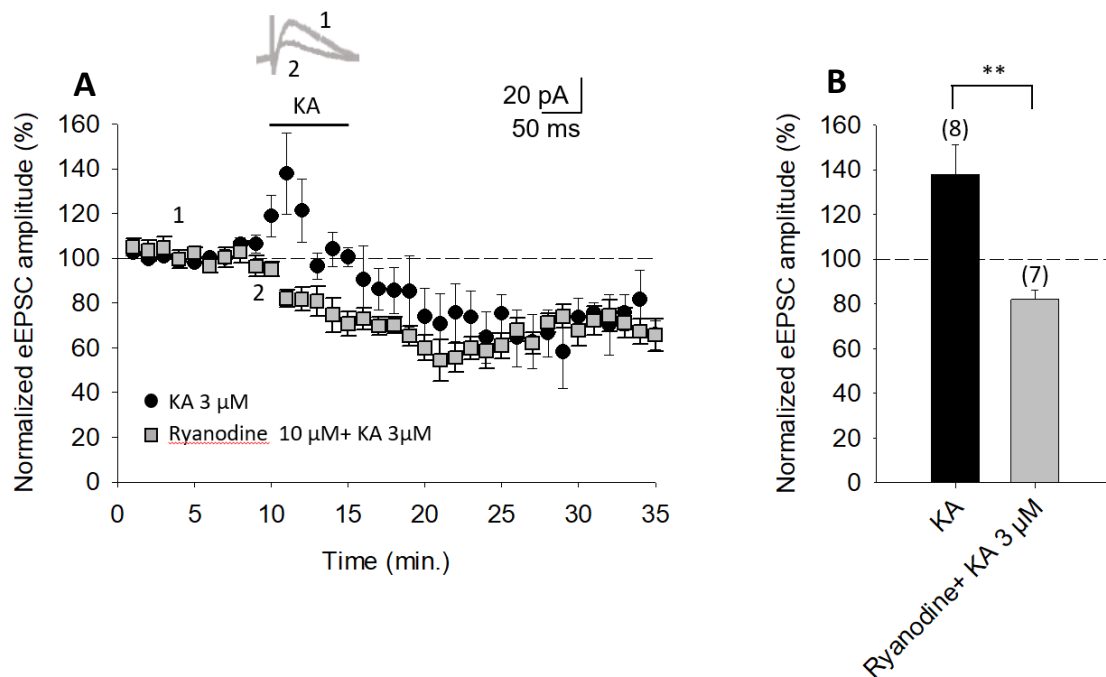


Figura 14.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas control y rodajas tratadas con ryanodine (10 μM). **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). En las rodajas tratadas con este fármaco, el incremento de las amplitudes de las eEPSCs inducidas por KA se previno. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

Estos resultados indican que los KARs presinápticos en la sinapsis PF-PuC son permeables a Ca^{2+} , y que la entrada de Ca^{2+} a través de estos KARs y canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de tipo L desencadenan la liberación de Ca^{2+} desde las reservas de Ca^{2+} intraterminales inducida por Ca^{2+} para producir la facilitación sináptica observada.

Es evidente que una entrada de Ca^{2+} vía KARs es necesaria para la mediación de la facilitación provocada por KA. Dado que en el hipocampo y en el córtex (donde se ha examinado previamente la modulación mediada por KAR), la activación del complejo de Ca^{2+} -calmodulina se ha mostrado necesaria para la activación de AC (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), se examinó esta vía reguladora en la sinapsis cerebelar PF-PuC a través del tratamiento de las rodajas con W-7, bloqueante de la calmodulina.

Con W-7 (25 μ M) presente, la facilitación mediada por KA (3 μ M) fue prevenida ($86 \pm 3\%$, $n = 6$, con W-7; en comparación a rodajas no tratadas, $136 \pm 13\%$, $n = 8$, **Figura 15**).

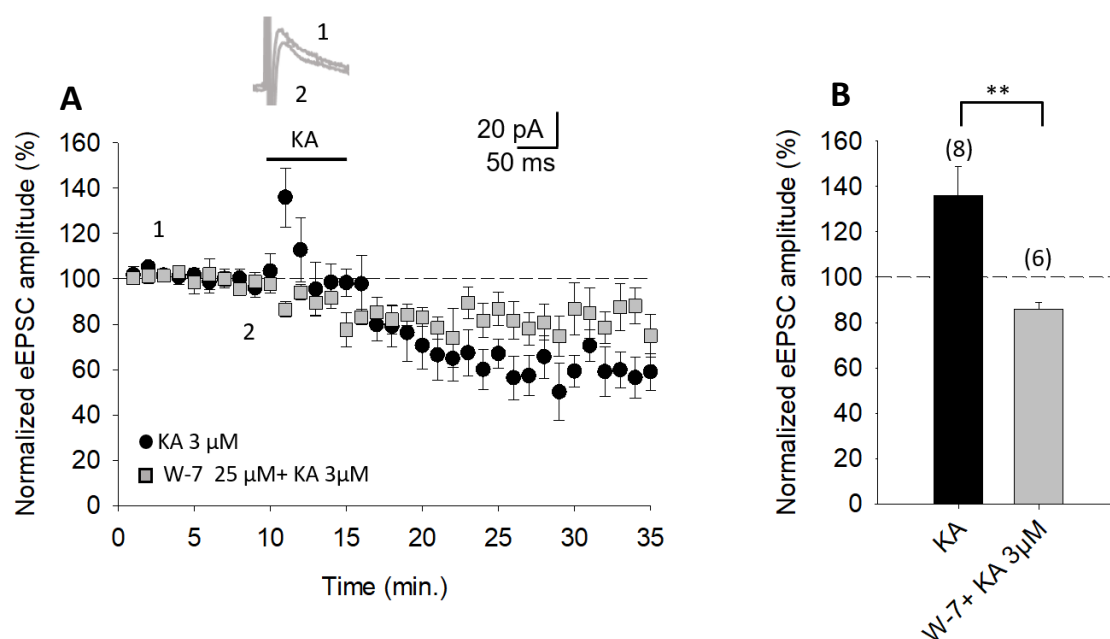


Figura 15.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con W-7 (25 μ M). (B) Cuantificación de la modulación observada en (A). En las rodajas tratadas con este fármaco, el incremento de las amplitudes de las eEPSCs inducidas por KA es bloqueado. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^* < 0.05$, ANOVA test).

La confirmación de la dependencia de la modulación a la calmodulina fue evidente también en experimentos realizados en presencia de calmidazolium (CMZ, 1 μ M), un inhibidor alternativo de la calmodulina. Al igual que ocurría con W-7, en presencia de CMZ, la facilitación sináptica mediada por KA (3 μ M) fue bloqueada (78 ± 6 , $n = 6$; en comparación a rodajas no tratadas, $136 \pm 13\%$, $n = 8$, **Figura 16**). Estos datos indican que un complejo de Ca^{2+} -calmodulina presináptico es necesario para la regulación sináptica mediada por KAR.

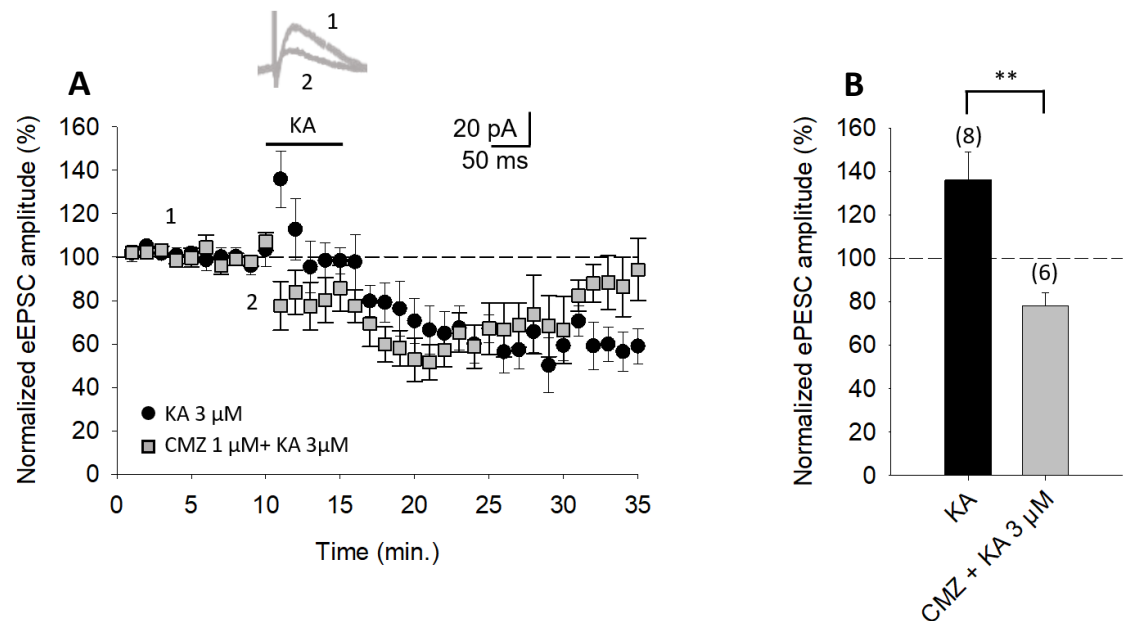


Figura 16.- (A) Curso temporal del efecto de KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas control y rodajas tratadas con CMZ (1 μ M). **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). En las rodajas tratadas con este fármaco, el incremento de las amplitudes de las eEPSCs inducidas por KA es bloqueado. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

4.2. PAPEL INHIBIDOR DE LOS RECEPTORES DE TIPO KAINATO EN LA REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS ESTABLECIDA ENTRE LAS CÉLULAS DE PURKINJE Y LAS FIBRAS PARALELAS DEL CEREBELO DE RATÓN.

4.2.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO POR MEDIO DE KA 3 μ M PRODUCE UNA DISMINUCIÓN EN LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES POSTSINÁPTICAS EXCITADORAS DE NMDA EN LA SINAPSIS FIBRAS PARALELAS-CÉLULAS DE PURKINJE.

Una vez evidenciado el efecto facilitador de las NMDA-eEPSCs mediado por 3 μ M de KA, se procedió a determinar si también media una disminución de la amplitud de las eEPSCs. Para ello, se realizaron experimentos de la misma manera que los llevados a cabo para estudiar el papel facilitador comentado en apartados anteriores. En este apartado, el foco se estableció en el estudio del papel inhibidor de la transmisión excitadora por KA.

Se observó que las sinapsis cerebelares de los ratones jóvenes adultos presentan una depresión evidenciable (tras una clara facilitación ya comentada en anteriores apartados) de las amplitudes de las corrientes postsinápticas evocadas mediadas por el receptor NMDA cuando se aplica 3 μ M de KA a las rodajas ($61 \pm 7\%$, $n = 8$, **Figura 17A**). Con una concentración de KA 0.3 y 1 μ M se observaron efectos menores que con una concentración de 3 μ M ($75 \pm 6\%$, $n = 6$; $73 \pm 9\%$, $n = 6$, respectivamente, **Figura 17B**), por ello, en estos experimentos se usó una concentración de 3 μ M de KA, con el objetivo de analizar el mecanismo de la depresión de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR, ya que a esta concentración se produce el máximo nivel de depresión.

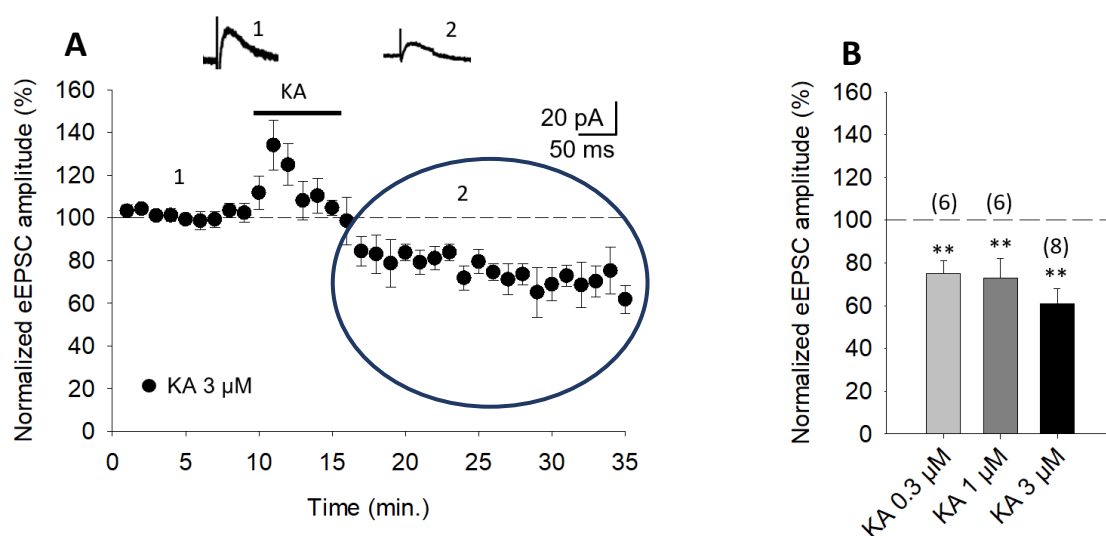


Figura 17.- (A) Curso temporal del efecto de kainato (KA) 3 μ M. Como se puede observar, KA disminuye la amplitud de las corrientes excitadoras postsinápticas en la sinapsis fibras paralelas- células de Purkinje (PF-PuC) en el cerebelo, produciendo un efecto bifásico claro. La parte superior de la figura muestra trazos de antes y durante la perfusión de KA. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en la Figura 1(A) a 3 μ M junto con la cuantificación de la modulación a diferentes dosis (0.3 μ M y 1 μ M concretamente). El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Para determinar si el efecto inhibitor de KA en las neuronas de Purkinje es mediado por la activación de KARs, se realizaron experimentos en presencia de NBQX, antagonista de AMPAR y KAR (**Figura 2A, B**), que como se indicó anteriormente, bloquea los receptores de KA una vez que los de AMPA fueron bloqueados previamente por GYKI 53655. Se observó que la depresión mediada por KA se previno ($95 \pm 4\%$, $n = 6$, en comparación al efecto de KA 3 μ M en rodajas sin tratar con NBQX ($61 \pm 7\%$, $n = 8$)).

Seguidamente, se comparó la depresión mediada por KA de las corrientes de tipo NMDA (con GYKI53655 presente) y las de tipo AMPA, registradas a -70 mV (con D-AP5 50 μ M y bicuculline 10 μ M, para bloquear respectivamente los receptores NMDA y GABA_A), observándose que KA media una reducción comparable en las eEPSCs de tipo NMDA ($67 \pm 5\%$, $n=6$) y AMPA ($71 \pm 2\%$, $n=5$) (**Figura 18**).

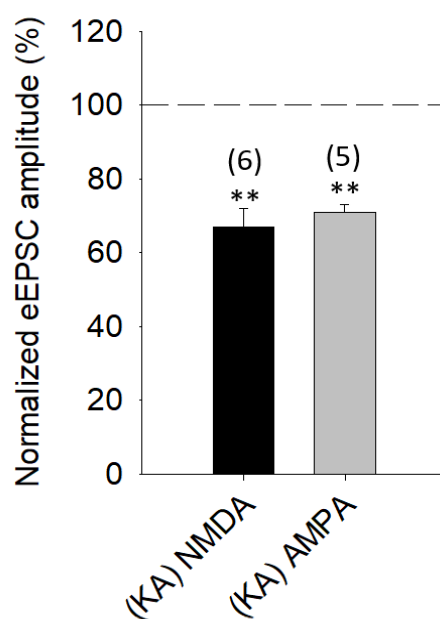


Figura 18.- Efecto de KA 3 μ M sobre las corrientes de tipo NMDA y AMPA, respectivamente. Se observa que el efecto inhibitor del KA sobre estas corrientes es prácticamente idéntico. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

Esta depresión de las amplitudes de las eEPSCs mediadas por los receptores de NMDA y AMPA indica que la modulación de KA ocurre a nivel presináptico, a través de una disminución de la liberación de glutamato.

4.2.2. LA DEPRESIÓN DE LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA MEDIADA POR KA EN LA SINAPSIS PF-PuC DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE cAMP Y DE PKA.

Se procedió a examinar el sistema de segundos mensajeros que median la depresión de las eEPSCs. Al igual que para el estudio de la facilitación, en primer lugar, se determinó si la PKA está involucrada en la disminución de las eEPSCs, inhibiendo la activación de la PKA con los inhibidores cAMP-Rp y H-89. En rodajas tratadas con 100 μ M de cAMP-Rp ó 2 μ M de H-89, la disminución de la amplitud de las eEPSCs mediada por KA se previno ($91 \pm 8\%$, $n = 7$ en rodajas tratadas con cAMP-Rp; $93 \pm 5\%$, $n = 7$, en rodajas tratadas con H-89; en comparación con rodajas no tratadas, $60 \pm 7\%$, $n = 14$; **Figura 19**).

Estos datos tomados en conjunto apuntan a que la PKA juega un papel obligatorio en la modulación mediada por KA en la transmisión glutamatérgica cerebelosa de la sinapsis PF-PuC. De esta manera, la inhibición de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en esta sinapsis implica la vía de señalización AC/cAMP/PKA. Sin embargo, dado que en otras preparaciones de rodajas la proteína quinasa C (PKC) se ha visto también implicada en aspectos de la modulación mediada por KAR (para revisión ver Rodríguez-Moreno y Sihra, 2007 a,b), se examinó si esta quinasa juega algún rol en la modulación de la sinapsis PF-PuC por KA. Para ello, se utilizó calphostin C (1 μ M) para bloquear específicamente la PKC, en presencia de este inhibidor de PKAC, el efecto de KA no se previno ($64 \pm 9\%$, $n = 6$, en comparación al efecto de KA en rodajas control no tratadas, $60 \pm 7\%$, $n = 14$; **Figura 19**), lo que indicó que la PKC no está implicada en la modulación observada.

Así mismo, y como se observó en apartados anteriores, los mecanismos que median la facilitación de la liberación de glutamato mediada por KAR implican la activación del complejo de calcio-calmodulina para la activación de AC, por ello, se comprobó si este mecanismo opera también en la depresión de la transmisión observada. Para ello, se examinó esta vía reguladora en la sinapsis PF-PuC a través del tratamiento de las rodajas con el antagonista de la calmodulina W-7 antes de registrar las eEPSCs. Se comprobó que con W-7 25 μ M presente, la depresión mediada por KA (3 μ M) no se vio

afectada ($75 \pm 7\%$, $n = 6$, en comparación al efecto de KA $3 \mu\text{M}$ en rodajas control no tratadas, $60 \pm 7\%$, $n = 14$; **Figura 15A y Figura 19**).

Así mismo, se realizaron experimentos en presencia de calmidazolium (CMZ, $1 \mu\text{M}$), y al igual que ocurría con W-7, en presencia de CMZ, la depresión de la transmisión sináptica mediada por KA ($3 \mu\text{M}$) no fue bloqueada ($52 \pm 10\%$, $n = 6$, en comparación a al efecto de KA $3 \mu\text{M}$ en rodajas no tratadas, $60 \pm 7\%$, $n = 14$; **Figura 16A y Figura 19**). Por tanto, estos datos muestran que el complejo de Ca^{2+} -calmodulina presináptico no es necesario para la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC.

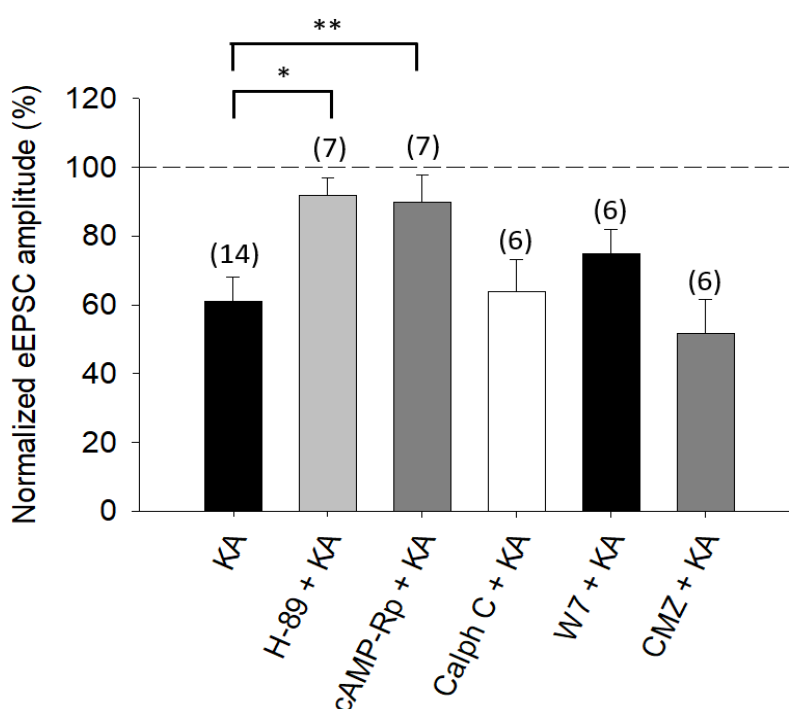


Figura 19.- Resumen de los resultados. El bloqueo de la PKA por H-89 ($2 \mu\text{M}$) o cAMP-Rp ($100 \mu\text{M}$) previno la acción depresiva de KA. El bloqueo de la proteína kinasa C (PKC) con calphostin C ($1 \mu\text{M}$) no previno la disminución de la amplitud de las eEPSCs. Así mismo, se observó una depresión similar a la de los controles en las amplitudes de las eEPSCs en rodajas tratadas con $25 \mu\text{M}$ de W-7 o $1 \mu\text{M}$ de CMZ. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones) se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, ANOVA test).

4.2.3. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO MEDIADA POR KAR REQUIERE PROTEÍNA G EN LA SINAPSIS PF-PuC.

Se ha reportado que la proteína G está involucrada en la señalización de KAR desde que se descubrió su papel en la modulación de la liberación de GABA mediada por KAR en el hipocampo (ver para revisión Negrete-Díaz et al., 2018). Así mismo, también se ha observado la participación de la proteína G en la modulación de la liberación de glutamato mediada por KAR en el hipocampo (Negrete-Díaz et al, 2006) y la amígdala (Negrete-Díaz et al., 2012). En esta investigación se determinó si el efecto facilitador de la activación de KAR presinápticos involucra la función de una proteína G, examinando el efecto de KA en rodajas tratadas con Pertussis toxin (PTx, 5 µg/ml), mostrando que la facilitación de la transmisión sináptica mediada por KAR se mantuvo y no se vio afectada por el bloqueo de la proteína G (**Figura 10**). Sin embargo, el efecto inhibitor de KA en esta sinapsis fue prevenido por PTx ($102 \pm 6\%$, $n = 6$, en comparación a KA 3 µM, $62 \pm 9\%$, $n = 6$, tras un aumento transitorio de las eEPSCs de $131 \pm 9\%$ sobre la amplitud de la línea base, $n=6$, **Figura 20**), implicando por ello una participación selectiva de la proteína G en la modulación inhibitora por KAR.

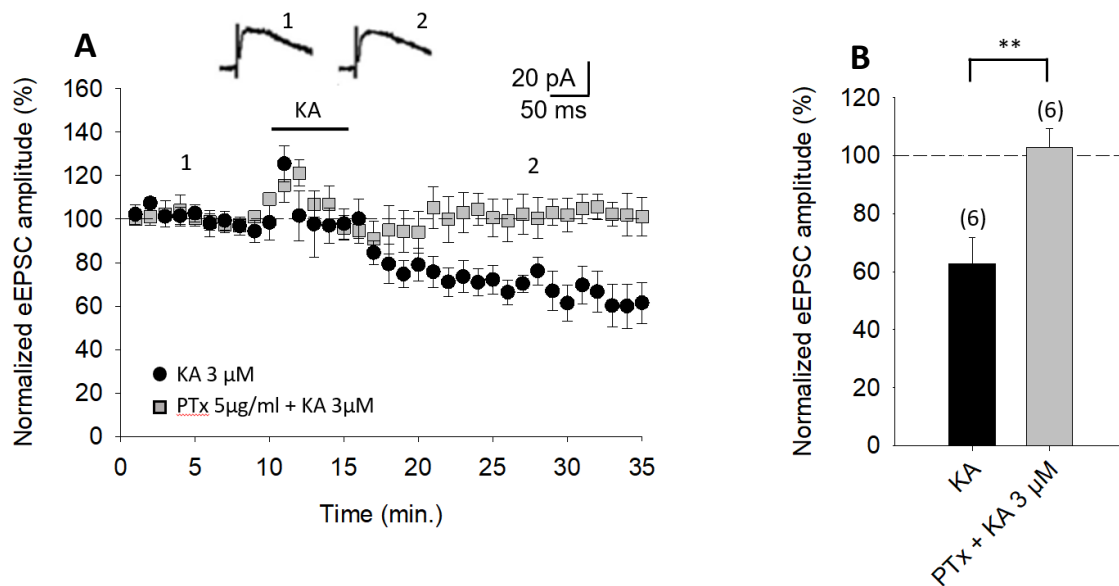


Figura 20.- Depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR en rodajas tratadas con pertussis toxin. **(A)** Curso temporal del efecto del KA sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control y rodajas tratadas con pertussis toxin. La figura muestra trazas representativas que muestran que KA (3 μ M) no ejerce efecto inhibitor en la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con pertussis toxin. **(B)** Cuantificación de la modulación observada en (A). El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM ($p^{**} < 0.01$, test t de Student).

4.2.4. LA DEPRESIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS PF-PuC NO ESTÁ MEDIADA POR KAR PERMEABLES A CALCIO Y NO REQUIERE DE LA LIBERACIÓN DE CALCIO DE LOS RESERVORIOS INTRACELULARES.

Como se ha descrito anteriormente, el papel del Ca^{2+} en la facilitación sináptica mediada por KAR ha sido sujeto de debate y controversia en diversas zonas. Por ello, para examinar la necesidad del Ca^{2+} en esta sinapsis cerebelar para deprimir la liberación de glutamato, se examinó primero el efecto que ejerce ryanodine, que, como se ha indicado, inhibe de forma selectiva la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Berridge, 1998). El tratamiento con ryanodine (10 μM) no tiene efecto sobre la depresión de la transmisión mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC ($69 \pm 9\%$, $n = 7$, con ryanodine, en comparación al efecto de KA 3 μM en rodajas no tratadas, $62 \pm 7\%$, $n = 6$, **Figura 21**). Lo mismo ocurre con el tratamiento con nimodipine, que no previno la depresión de las EPSC mediada por KA ($63 \pm 12\%$, $n = 6$ con nimodipine, en comparación a $62 \pm 7\%$, $n = 6$ en rodajas no tratadas, **Figura 21B**).

En segundo lugar, con el objetivo de establecer si la activación de KAR provoca una señal de Ca^{2+} que requiere de amplificación mediante la movilización de Ca^{2+} intracelular almacenado, se examinó el efecto de KA tras el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} intracelulares, utilizando thapsigargin para inhibir la bomba SERCA, responsable de la acumulación de Ca^{2+} en las reservas. El tratamiento con thapsigargin 2 μM no afectó a la depresión mediada por KA ($68 \pm 9\%$, $n = 6$, en comparación con rodajas no tratadas, $62 \pm 7\%$, $n = 6$, **Figura 21B**).

Así mismo, para descartar la posibilidad de que la presencia de KAR permeables a Ca^{2+} jueguen el mismo rol en los mecanismos dependientes de KA en esta sinapsis cerebelar, se investigó el efecto del KA en las amplitudes de las eEPSCs en presencia de philanthotoxin (toxina que bloquea KARs permeables a Ca^{2+}). Tras el tratamiento de las rodajas con philanthotoxin a una concentración de 3 μM , la depresión sináptica mediada por KA 3 μM no fue evitada (de $56 \pm 1\%$, $n = 7$, en comparación al efecto de KA en rodajas no tratadas, $62 \pm 7\%$, $n = 6$, **Figura 21B**).

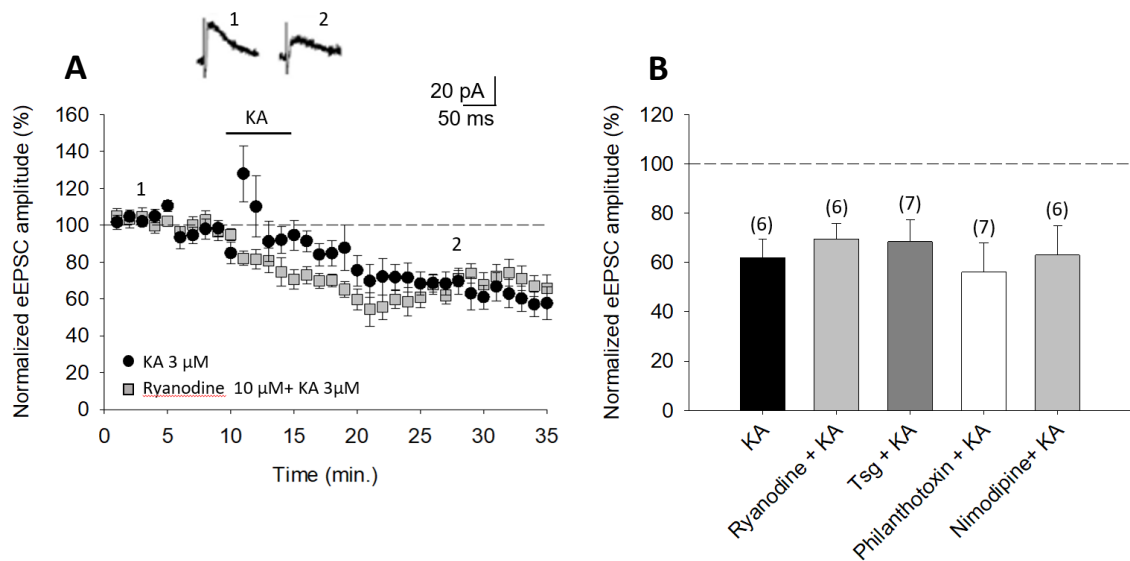


Figura 21.- La depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR no requiere cambios en el Ca^{2+} citosólico en la sinapsis PF-PuC. **(A)** Curso temporal del efecto de KA (3 μ M) sobre la amplitud de las eEPSCs en rodajas control (círculos) y rodajas tratadas con ryanodine (cuadrados). La figura muestra trazas representativas que muestran que KA (3 μ M) deprime la amplitud de las eEPSCs en rodajas tratadas con ryanodine. **(B)** Cuantificación de los resultados en rodajas tratadas con ryanodine, thapsigargin, philanthotoxin y nimodipine. La disminución de las amplitudes de las eEPSCs inducida por KA no se previene en ningún caso. El número de rodajas utilizadas (media de dos a cuatro ratones), se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra. Los resultados se expresan como medias \pm SEM. ANOVA test.

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio realizado en rodajas de cerebelo de ratón muestran que la activación de los receptores de kainato presinápticos en el cerebelo, en las sinapsis PF-PuC, provoca una facilitación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato. Así mismo, el análisis de esta modulación sugiere la presencia de un acoplamiento de KARs a través de la actividad de la Ca^{2+} -calmodulina/AC/cAMP/PKA, pero independientemente de la activación de la proteína G.

5.1. LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UN AUMENTO DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS PF-PUC DE CEREBELO.

5.1.1. El Efecto de KA sobre la amplitud de los eEPSCs se debe a la activación de receptores de KA.

Los resultados de este estudio, utilizando la técnica de patch-clamp para registrar corrientes de tipo NMDA en presencia de sustancias antagonistas de receptores de AMPA en rodajas de cerebelo, permitió determinar que el efecto de facilitación observado se debe a la activación de receptores de tipo kainato. Así mismo, al prevenir por completo el efecto de facilitación en presencia de NBQX se confirmó que este efecto se debe, en efecto, a la activación de estos receptores. Por ello, se puede afirmar que la activación de KARs en la sinapsis PF-PuC provoca una facilitación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato.

5.1.2. El Mecanismo de acción de los KARs en la facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis PC-PuC de cerebelo es presináptico.

Al evaluar la regulación sináptica, es de suma importancia identificar la localización subcelular de los KARs en estudio. Se determinó la presencia presináptica de KARs a través de diferentes análisis, como, por ejemplo, el PPR (pair-pulse ratio) de eEPSCs consecutivas. De esta manera, una clara reducción en el PPR de las eEPSCs

observada con aplicación de KA, sugiere un aumento en la probabilidad de liberación (por definición, una propiedad presináptica en la transmisión sináptica).

En segundo lugar, se evaluó la proporción de fallos sinápticos en respuesta a la aplicación de KA, encontrando que, con KA presente, la proporción de fallos fue disminuida de forma evidente, lo que indica un aumento en la probabilidad de liberación del transmisor presináptico.

Finalmente, los efectos de KA observados en las eEPSCs mediadas por los receptores NMDA y AMPA fueron similares. Dado que no se observarían resultados como esos si la modulación observada fuera postsináptica, los resultados obtenidos respaldan la presencia de un modo de acción presináptico.

Por tanto, tomando en conjunto los tres análisis independientes, se puede concluir que la facilitación involucra un locus de acción presináptico de los KARs que actúan en la sinapsis PF-PuC.

A pesar de estos resultados, queda por dilucidar si la regulación presináptica llevada a cabo por KA en la sinapsis PF-PuC informa de la actividad de los receptores de kainato localizados subcelularmente en el terminal/axón o en compartimentos somatodendríticos. El abordaje necesario para responder estas cuestiones está más allá del trabajo aquí realizado. Sin embargo, para dilucidar directamente la compartimentación presináptica de los receptores de kainato, trabajos futuros necesitan: inmunolocalización de alta resolución (basada en etiquetado de inmunogold) del receptor (dependiendo de la disponibilidad de anticuerpos de alta afinidad con especificidad de la subunidad KAR apropiada); y bloqueo dirigido de KARs utilizando antagonistas encapsulados (ver estudios del receptor NMDA, Rodríguez-Moreno et al., 2011; Reeve et al., 2012).

5.1.3. La facilitación de la transmisión glutamatérgica mediada por KARs en la sinapsis PF-PuC requiere señalización dependiente de cAMP.

Correspondiendo con estudios previos en el hipocampo y el córtex (Rodríguez-Moreno y Sihra, 2004, 2013; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), la inhibición de PKA por el análogo de nucleótidos cíclicos permeable, cAMP-Rp, condujo a la anulación de la potenciación de la transmisión sináptica/liberación de glutamato mediada por KA en la sinapsis PF-PuC. La congruencia del mecanismo entre sinapsis ha sido también señalada en el presente estudio, ya que se ha observado que la inhibición de la actividad catalítica de PKA a través de H-89 eliminó la facilitación mediada por KA. De forma similar, la activación directa de AC por la preincubación con forskolin, produjo refractariedad del efecto facilitador del KA. Por ello, y tomados en conjunto, estos datos sugieren de manera consistente que la señalización de AC/cAMP/PKA sustenta la modulación facilitadora de la transmisión sináptica/liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC.

Por otra parte, se ha determinado que no es necesaria una proteína G que medie la iniciación/transducción de la cascada AC/cAMP/PKA involucrada en la liberación de glutamato mediada por KAR presináptico. Por ello, el siguiente paso en este estudio fue estudiar el rol del Ca^{2+} como iniciador de una cascada de señalización independiente de proteína G en la sinapsis PF-PuC.

5.1.4. La facilitación de la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PuC está mediada por KAR presinápticos permeables a Ca^{2+} .

Los KARs pueden mediar la entrada externa de Ca^{2+} a través de actividad ionotrópica que despolarizaría los terminales activados por canales de Ca^{2+} . La influencia directa del Ca^{2+} vía KARs permeables a Ca^{2+} como tal es también posible (Fletcher y Lodge, 1996; Scott et al., 2008).

De manera particular, los experimentos realizados en el presente estudio muestran que un bloqueo de KARs permeables a Ca^{2+} a través del inhibidor selectivo como la philanthotoxin, impiden la facilitación sináptica mediada por KA, lo que sugiere que la

entrada de Ca^{2+} vía KARs y canales de calcio es un requisito estricto para la modulación facilitadora. Por tanto, resultaría interesante que, aunque se piensa que los KARs permeables a Ca^{2+} no editados suelen prevalecer de forma temprana durante el desarrollo neuronal, estos receptores se mantienen con actividad de forma evidente en el cerebelo de ratones jóvenes adultos.

Se extendió el análisis de las propiedades de la regulación mediada por KAR a través de examinar la hipótesis de la idea fundamental de que la entrada de Ca^{2+} a través de KARs puede ser amplificada por medio de la movilización de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, como ha sido reportado de modulaciones similares en sinapsis hipocámpales (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Los resultados obtenidos en este estudio apoyaron la idea de que las reservas de Ca^{2+} intracelular ejercen un rol crítico, ya que se mostró que el tratamiento con thapsigargin (para agotar las reservas de Ca^{2+} intracelular), abolió la regulación facilitadora regulada por KARs. Así mismo, y corroborando esta hipótesis, el tratamiento con ryanodine para inhibir de forma selectiva la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Berridge, 1998), evidenció que la entrada de Ca^{2+} vía KARs y canales de calcio induce la movilización de Ca^{2+} desde las reservas intraterminales para provocar la modulación estudiada.

Una vez demostrado que la entrada de Ca^{2+} vía KARs y canales de calcio, y el subsecuente incremento de Ca^{2+} debido a la movilización de Ca^{2+} desde las reservas intraterminales es realmente obligatorio para la facilitación de KA en la transmisión sináptica en la sinapsis PF-PuC, la siguiente pregunta fue cómo podría un aumento del Ca^{2+} citosólico acoplarse a la señalización establecida de AC/cAMP/PKA que media la facilitación por KARs. Según estudios anteriores, es posible que el aumento en el Ca^{2+} citosólico active la AC dependiente de Ca^{2+} presente en los terminales de las fibras paralelas. Se han descrito un gran número de ACs, sin embargo, AC1 y AC8 son dos miembros de la familia que han mostrado que se activan por Ca^{2+} -calmodulina, siendo abundantes en el sistema nervioso central (para revisión ver Cooper, 2003; Wang y Storm, 2003). Curiosamente, apoyando su importancia para esta hipótesis, estudios con doble knockouts de AC1 y AC8 han mostrado que los ACs de Ca^{2+} -calmodulina son, en efecto, esenciales para la elevación de cAMP dependiente de Ca^{2+} (Wong et al., 1999). Utilizando los antagonistas de la calmodulina W-7 y CMZ, los resultados obtenidos

muestran que la inhibición de la función de la Ca^{2+} -calmodulina elimina la modulación presináptica mediada por KAR en rodajas cerebelares. Esto apoya la hipótesis de que, tras la activación de KAR y la elevación de Ca^{2+} citosólico, un acoplamiento de Ca^{2+} -calmodulina dependiente puede activar AC1 y/o AC8, y por tanto extenderse a la iniciación de la cascada AC/cAMP/PKA, promoviendo así la facilitación sináptica a través del incremento de la liberación del neurotransmisor en las sinapsis PF-PuCs.

5.2.LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE KAINATO PRODUCE UNA DISMINUCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE GLUTAMATO EN LA SINAPSIS PF-PUC DE CEREBELO

Los resultados de este estudio en rodajas de cerebelo de ratón, muestran, además de un efecto de facilitación de la transmisión sináptica, que la activación de receptores de kainato presinápticos en el cerebelo en las sinapsis PF-PuC, median una depresión de la misma. El análisis de esta modulación muestra la presencia de un acoplamiento mecanicista de KARs a la actividad de PKA mediante la activación de una proteína G.

5.2.1. El Efecto inhibitor de KA sobre la Amplitud de los EPSCs se debe a la Activación de Receptores de KA.

La disminución observada en las eEPSCs en las sinapsis PF-PuC se debe a una disminución en la liberación de glutamato, que fue monitorizada, al igual que en los experimentos anteriormente comentados, a través de las corrientes mediadas por el receptor NMDA (con los receptores AMPA antagonizados por GYKI53655), y bloqueado por NBQX, antagonista de los receptores KAR/AMPA. Por ello, bajo condiciones donde la activación del receptor AMPA es bloqueada a través de GYKI53655, el papel específico de los KARs en la regulación depresiva es claro.

5.2.2. El mecanismo de acción de los KARs en la disminución de la liberación de glutamato en la sinapsis PC-PuC de cerebelo es presináptico.

Al igual que ocurre en el efecto de facilitación, los efectos de KA observados en las eEPSCs mediadas por los receptores NMDA y AMPA fueron similares.

Este resultado sugiere un locus de acción presináptico de los KARs que actúan en la sinapsis PF-PuC, provocando una depresión de la liberación de glutamato en esta sinapsis cerebelar.

5.2.3. La inhibición de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC depende de la señalización dependiente de cAMP.

Al igual que ocurre con el fenómeno de facilitación, la inhibición de la PKA por el análogo de nucleótidos cíclicos permeables a las células cAMP-Rp, conduce a la anulación de la depresión de la transmisión sináptica mediada por KA en la sinapsis PF-PuC. De igual manera, se observó que la inhibición de la actividad catalítica de PKA por H-89 eliminó la depresión mediada por KA. Esto indica que la inhibición de la transmisión glutamatérgica mediada por KAR en esta sinapsis requiere la vía de señalización AC/cAMP/PKA.

Así mismo, al igual que ocurre en el fenómeno de facilitación mediada por KA, la proteína quinasa C no está implicada en la inhibición de la transmisión sináptica, siendo prueba de ello los resultados obtenidos al utilizar calphostin C para inhibir dicha quinasa.

Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el fenómeno de facilitación, los mecanismos que median la inhibición de la liberación de glutamato mediada por KAR no implican la activación del complejo calcio-calmodulina para la activación de AC en la sinapsis PF-PuC, ya que al utilizar el antagonista de la calmodulina W-7, así como calmidazolium, la depresión no se vio bloqueada, mostrando así que el complejo de Ca^{2+} -calmodulina presináptico no es necesario para la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR en la sinapsis PF-PuC.

5.2.4. La depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR requiere de la activación de proteína G en la sinapsis PF-PuC.

En contraste con el mecanismo que media el aumento de la liberación de glutamato; para la depresión, la prevención del funcionamiento correcto para la proteína

G mediante el tratamiento con PTx impidió la depresión de la liberación de glutamato mediada por KAR, mostrando que existe una transducción/iniciación mediada por proteína G, seguida de una señalización de cAMP para la subsecuente activación de PKA.

5.2.5. La depresión de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC no está mediada por KAR permeables a calcio y no requiere de la liberación de calcio de las reservas intracelulares.

En el contexto habitual, los KAR pueden mediar la entrada de Ca^{2+} externo a través de actividad ionotrópica (Fletcher y Lodge, 1996; Perkinson y Sihra, 1999; Scott et al., 2008), o el Ca^{2+} puede ser liberado de los reservorios intracelulares, sin embargo, en los resultados aquí mostrados, un bloqueo de KAR permeables a Ca^{2+} a través del inhibidor selectivo philanthotoxin, o a través del tratamiento de las rodajas con ryanodine, thapsigargin o nimodipine, no canceló la depresión sináptica mediada por KA, descartando la entrada de Ca^{2+} a través de KARs o la liberación de calcio desde las reservas intracelulares como participantes en el proceso de señalización que media la depresión observada de la liberación de glutamato mediada por la activación de KAR., al contrario de lo que ocurre en el fenómeno de facilitación de la transmisión sináptica estudiada en el presente trabajo.

5.3. IMPLICACIONES

Este estudio muestra que la sinapsis PF-PuC es un modelo confiable y robusto para el estudio de la modulación mediada por KAR. Curiosamente, sin embargo, se observó una facilitación de la transmisión sináptica excitadora con 3 μM de KA, al contrario que en trabajos previos realizados en la misma sinapsis, donde 500 nM de KA inducía depresión en la liberación de glutamato (Delaney y Jahr, 2002). Esta discrepancia puede reflejar la gran diferencia en las concentraciones de agonista empleadas, así como la diferencia en la edad de los animales, o incluso la diferencia de las especies usadas en experimentos previos (Delany y Jahr, 2002, utilizaron ratas P13-P17). La mayor concentración de KA necesaria para la activación de KARs en sinapsis de jóvenes adultos puede ser indicativa de las diferentes eficacias de KA en los receptores de kainato en esta

edad, quizás dependiente de la expresión de subtipos específicos de subunidades del receptor de glutamato que componen los KARs.

Para los resultados mostrados en este trabajo, está claro que la función de los KAR está preservada en animales jóvenes adultos en la sinapsis PF-PuC, y no está temporalmente limitada a las dos primeras semanas postnatales como ha sido previamente reportado (Delaney y Jahr, 2002). Los KARs tienen un papel de autoreceptor en el desarrollo animal, y la concentración del agonista determina la modulación presináptica: facilitación (a bajas concentraciones) y depresión (a altas concentraciones) y, por lo tanto, determinando probablemente la consolidación y estabilidad en la sinapsis (**Figura 1**).

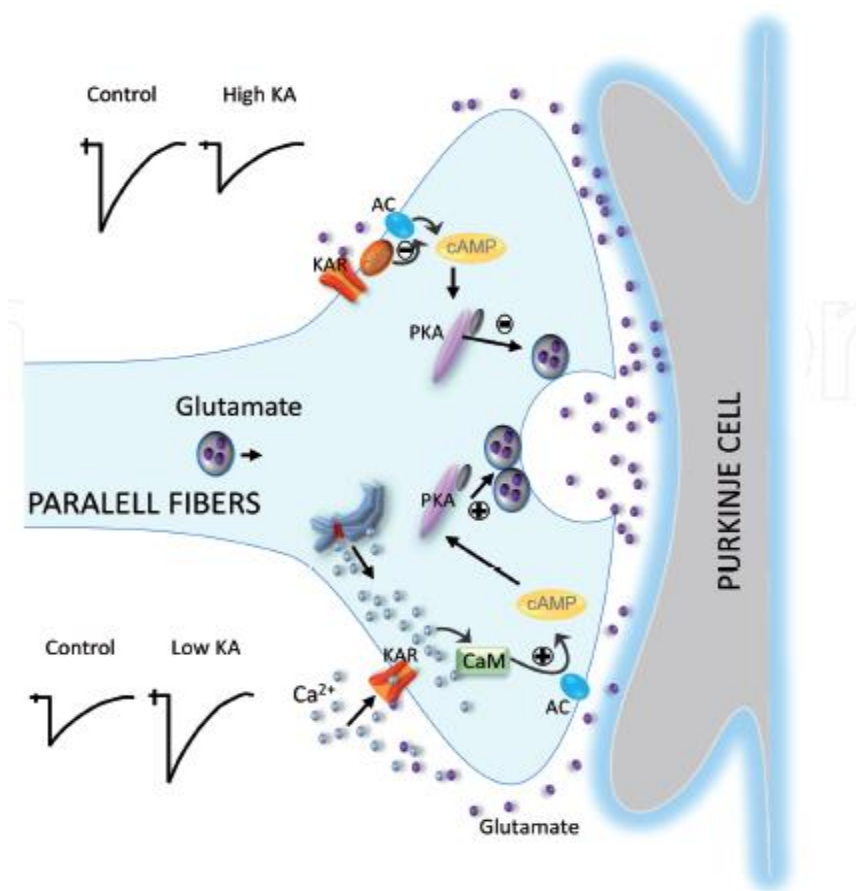


Figura 1.- Modulación de la liberación de glutamato mediada por KAR en el cerebelo. Acciones facilitadoras o depresoras de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC mediada por KARs. La activación de KAR con altas concentraciones de KA (>3μM) deprime la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC, un efecto que involucra a la proteína G y la adenilciclasa/cAMP/proteína quinasa A (AC/cAMP/PKA). La activación de KAR con bajas concentraciones de kainato (<0.3 μM) solo facilita la liberación de glutamato siguiendo la ruta de activación de Ca²⁺/AC/cAMP/PKA. Obtenido de Losada-Ruiz et al. (2018).

Aunque el papel preciso de estos KARs en animales adultos aún no ha sido explicado, la modulación de la función presináptica reportada en este trabajo podría manifestar algunas formas de plasticidad. Por ejemplo, se ha mostrado que los KARs están involucrados en plasticidad en la sinapsis PF-PuCs (para revisión ver Hirano, 2013; Sihra et al., 2014).

Así mismo, los KAR han estado implicados en algunas alteraciones cerebrales como la epilepsia (Falcón-Moya et al, 2018), pero si esto implica también al cerebelo no ha sido aún determinado. Sí se sabe que existe una relación directa entre la inyección de KA y la ataxia cerebelosa. Por tanto, el cerebelo es un objetivo importante para estudiar las funciones de los KARs y su posible papel como causante de la ataxia (Yamaguchi et al., 1984; De vera et al., 2002; Andoh et al., 2008). Además, en pacientes con esquizofrenia se observa un aumento en los KARs que contienen las subunidades GluK2 y GluK5 (Harrison et al, 1990; Bullock et al., 2008). En la neurodegeneración se ha encontrado que la aplicación local de KA en algunas áreas del cerebelo produce cambios en los diferentes niveles de iones, aumentando considerablemente los niveles de Ca^{2+} durante semanas, mediante el cual median la calcificación (Korf y Postema, 1984). Se ha descrito también que los KARs producen aumentos en el calcio intracelular (Savidge et al., 1997), y parecen indicar un aumento en el calcio intracelular sin poner a la célula en riesgo a causa de la excitotoxicidad debido a su baja conductancia en contraste con los AMPARs. Debido a la falta de conocimiento sobre el tema, son necesarias más investigaciones para determinar el rol de los KARs en el desarrollo del cerebelo, así como en las alteraciones cerebelosas.

Los experimentos realizados muestran que la activación por KAR presenta un efecto bifásico en la sinapsis PF-PuC, induciendo una depresión en la liberación de glutamato a concentraciones relativamente altas de KA ($>1-3 \mu\text{M}$) en lugar de facilitación. Los resultados han revelado que la depresión sináptica transitoria observada con altas concentraciones de KA fue abolida en presencia de cAMP-Rp (inhibiendo la activación de la PKA), pero no se ve afectada por ninguna de las manipulaciones experimentales de la regulación del Ca^{2+} citosólico o su función, es decir, thapsigargin, W-7 o CMZ. Estas observaciones apuntan a una depresión sináptica que implica una vía AC/cAMP/PKA, como se describe para la facilitación, pero sin el

acoplamiento Ca^{2+} -AC propuesto. Por tanto, se puede concluir que los KARs presentan modos mecanicistas alternativos para la acción facilitadora y la depresora. De hecho, el acoplamiento de KAR a un incremento en las concentraciones de cAMP (y la subsecuente activación de la actividad de PKA), o una disminución en las concentraciones de cAMP (y la subsecuente disminución en la actividad de PKA), ha sido reportada en estudios que investigan la sinapsis fibras musgosas-CA3 en el hipocampo (Negrete-Díaz et al., 2006, 2007; Andrade-Talavera et al., 2012), la amígdala (Negrete-Díaz et al., 2012), y el córtex (Andrade-Talavera et al., 2013).

La diferencia clave a la que apuntan los resultados de este trabajo es la diferente dirección y los medios de regulación de la cascada AC/cAMP/PKA en la regulación bimodal llevada a cabo por receptores de kainato. Mientras que la función facilitadora de los KARs implica un aumento en la señalización de AC/cAMP/PKA promovida por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, los KARs parecen estar acoplados negativamente a la vía AC/cAMP/PKA para afectar a la depresión de la transmisión sináptica. Estudios previos en la sinapsis MF-CA3 y en sinapsis talamocorticales (y como se confirma en este estudio), han reportado que la depresión de la función presináptica ocurre a través de un acoplamiento negativo a AC/cAMP/PKA, y en realidad es provocada por la acción de una proteína G sensible a PTx (Negrete-Díaz et al., 2006; Andrade-Talavera et al., 2013). A pesar del acoplamiento diferencial postulado de la AC para lograr la facilitación y la depresión, es también plausible que los mecanismos diametrales reflejen el funcionamiento de dos tipos distintos de KARs. Estudios futuros dilucidarán los componentes exactos envueltos en la modulación mediada por KAR y abordarán la cuestión de si diferentes poblaciones de KARs presinápticos residen en la sinapsis PF-PuC.

6. CONCLUSIONES

1. La activación de los receptores presinápticos de glutamato de tipo kainato produce un aumento de la liberación de glutamato, seguido de una depresión de la liberación del mismo (efecto bifásico) en la sinapsis fibras paralelas-células de Purkinje (PF-PuC) de cerebelo de ratón.
2. La facilitación de la liberación de glutamato en la sinapsis PF-PuC de cerebelo de ratón se debe a la activación de receptores de kainato presinápticos permeables a calcio.
3. La facilitación de la liberación de glutamato mediada por receptores de kainato presinápticos en la sinapsis PF-PuC de cerebelo de ratón requiere de la activación de una cascada de señalización calcio-calmodulina/AC/cAMP/PKA, así como elevados niveles de calcio en el citosol.
4. La depresión en la liberación de glutamato ocurrida tras la activación de los KARs en la sinapsis PF-PuC de cerebelo de ratón, se debe a la activación de receptores de kainato presinápticos.
5. La depresión en la liberación de glutamato mediada por la activación de los KARs en la sinapsis PF-PuC de cerebelo de ratón requiere de la activación de una proteína G que activa una cascada de señalización AC/cAMP/PKA en la que no participa la calcio-calmodulina.

7. REFERENCIAS

- Aizenman, E., Lipton, S. A., & Loring, R. H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron*, 2(3), 1257-1263.
- Alkon, D. L., & Nelson, T. J. (1990). Specificity of molecular changes in neurons involved in memory storage. *The FASEB Journal*, 4(6), 1567-1576.
- Andoh, T., Kishi, H., Motoki, K., Nakanishi, K., Kuraishi, Y., & Muraguchi, A. (2008). Protective effect of IL-18 on kainate-and IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2322-2328. DOI: 10.4049/jimmunol.180.4.2322
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2012). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca²⁺-calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *Journal of neurochemistry*, 122(5), 891-899. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2013). Pre-synaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca²⁺-calmodulin at thalamocortical synapses. *Journal of Neurochemistry*, 126(5), 565-578. DOI: 10.1111/jnc.12310
- Aronica, E., Dickson, D. W., Kress, Y., Morrison, J. H., & Zukin, R. S. (1997). Non-plaque dystrophic dendrites in Alzheimer hippocampus: a new pathological structure revealed by glutamate receptor immunocytochemistry. *Neuroscience*, 82(4), 979-991. DOI: 10.1016/S0306-4522(97)00260-1
- Artinian, J., Peret, A., Marti, G., Epsztein, J., & Crépel, V. (2011). Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 31(30), 10811-10818. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0388-11.2011
- Atoji, Y., & Sarkar, S. (2019). Localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor mRNAs in the pigeon cerebellum. *Journal of chemical neuroanatomy*, 98, 71-79.

- Bahn, S., Volk, B., & Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience*, 14(9), 5525-5547. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05525.1994
- Banerjee, A., González-Rueda, A., Sampaio-Baptista, C., Paulsen, O., & Rodríguez-Moreno, A. (2014). Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiological reports*, 2(3), e00271. DOI: 10.1002/phy2.271
- Banerjee, A., Meredith, R. M., Rodríguez-Moreno, A., Mierau, S. B., Auberson, Y. P., & Paulsen, O. (2009). Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptor antagonists in mouse barrel cortex. *Cerebral cortex*, 19(12), 2959-2969. DOI: 10.1093/cercor/bhp067
- Bassani, S., Cingolani, L. A., Valnegri, P., Folci, A., Zapata, J., Gianfelice, A., ... & Passafaro, M. (2012). The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron*, 73(6), 1143-1158. DOI: doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.021
- Bennett, J. A., & Dingledine, R. (1995). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron*, 14(2), 373-384.
- Begni, S., Popoli, M., Moraschi, S., Bignotti, S., Tura, G. B., & Gennarelli, M. (2002). Association between the ionotropic glutamate receptor kainate 3 (GRIK3) ser310ala polymorphism and schizophrenia. *Molecular psychiatry*, 7(4), 416-418. DOI: 10.1038/sj.mp.4000987
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26.
- Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E. S., Moll, C., & Heinemann, S. (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron*, 5(5), 583-595. DOI: doi.org/10.1016/0896-6273(90)90213-Y

- Breustedt, J., & Schmitz, D. (2004). Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(45), 10093-10098. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3078-04.2004
- Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Delany, C. M., Parry, M. C., Smolders, I., Vignes, M., ... & Ogden, A. (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature*, 402(6759), 297-301.
- Bowie, D. (2008). Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 7(2), 129-143.
- Bowie, D., Lange, G. D., & Mayer, M. L. (1998). Activity-dependent modulation of glutamate receptors by polyamines. *Journal of Neuroscience*, 18(20), 8175-8185.
- Brodal, P. (2004). The central nervous system: structure and function. *Oxford University Press*.
- Buchanan, K. A., Blackman, A. V., Moreau, A. W., Elgar, D., Costa, R. P., Lalanne, T., ... & Sjöström, P. J. (2012). Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron*, 75(3), 451-466. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.017
- Bullock, W. M., Cardon, K., Bustillo, J., Roberts, R. C., & Perrone-Bizzozero, N. I. (2008). Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients. *American Journal of Psychiatry*, 165(12), 1594-1603. DOI: 10.1176/appi.ajp.2008.07121845
- Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S. F., & Mulle, C. (1999). Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 19(2), 653-663. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-02-00653.1999
- Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., & Sakmann, B. (1992). Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron*, 8(1), 189-198.

- Burnashev, N., Villarroel, A., & Sakmann, B. (1996). Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *The Journal of Physiology*, 496(1), 165-173. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021674
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., & Sakmann, B. (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of physiology*, 485(2), 403-418. DOI: 10.1113/jphysiol.1995.sp020738
- Campbell, S. L., Mathew, S. S., & Hablitz, J. J. (2007). Pre-and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology*, 53(1), 37-47. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.04.008
- Carlson, K. M., Andresen, J. M., & Orr, H. T. (2009). Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Current opinion in genetics & development*, 19(3), 247-253.
- Choi, Y. B., & Lipton, S. A. (2000). Redox modulation of the NMDA receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(11), 1535-1541.
- Collingridge, G. L., Isaac, J. T., & Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 952-962.
- Contractor, A., Sailer, A. W., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G. T., & Heinemann, S. F. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2^{-/-} mice. *Journal of Neuroscience*, 23(2), 422-429. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-02-00422.2003
- Cooper, D. M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochemical Journal*, 375(3), 517-529. DOI: 10.1042/bj20031061
- Crépel, F. (2009). Role of Presynaptic Kainate Receptors at Parallel Fiber–Purkinje Cell Synapses in Induction of Cerebellar LTD: Interplay With Climbing Fiber Input. *Journal of neurophysiology*, 102(2), 965-973. doi.org/10.1152/jn.00269.2009
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE*, 2004(255), re16-re16. DOI: 10.1126/stke.2552004re16

- Dargan, S. L., Clarke, V. R., Alushin, G. M., Sherwood, J. L., Nisticò, R., Bortolotto, Z. A., ... & Mayer, M. L. (2009). ACET is a highly potent and specific kainate receptor antagonist: characterisation and effects on hippocampal mossy fibre function. *Neuropharmacology*, 56(1), 121-130. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.016
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., ... & Chen, H. S. V. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 393(6683), 377-381.
- Delaney, A. J., & Jahr, C. E. (2002). Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron*, 36(3), 475-482. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)01008-5
- De Vera, N., Camón, L., & Martínez, E. (2002). Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *European neuropsychopharmacology*, 12(5), 397-405. DOI: 10.1016/S0924-977X (02)00050-0
- De Zeeuw, C. I. (Ed.). (1997). The cerebellum: from structure to control. *Elsevier*.
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), 101-113.
- Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., & Heinemann, S. (1991). Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature*, 351(6329), 745-748.
- Estabel, J., König, N., & Exbrayat, J. M. (1999). AMPA/kainate receptors permeable to divalent cations in amphibian central nervous system. *Life sciences*, 64(8), 607-616.
- Falcón-Moya, R., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Kainate receptors: role in epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 217. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00217
- Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., ... & Contractor, A. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for

ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron*, 63(6), 818-829.
10.1016/j.neuron.2009.08.010

Fletcher, E. J., & Lodge, D. (1996). New developments in the molecular pharmacology of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 70(1), 65-89. DOI: 10.1016/0163-7258(96)00014-9

Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), 301-310. DOI: 10.1016/j.nrl.2011.10.014

Flores, G., Negrete-Díaz, J. V., Carrión, M., Andrade-Talavera, Y., Bello, S. A., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2011). 25 Excitatory Amino Acids in Neurological and Neurodegenerative Disorders.

Fleck, M. W., Cornell, E., & Mah, S. J. (2003). Amino-acid residues involved in glutamate receptor 6 kainate receptor gating and desensitization. *Journal of Neuroscience*, 23(4), 1219-1227. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-04-01219.2003

Fritsch, B., Reis, J., Gasior, M., Kaminski, R. M., & Rogawski, M. A. (2014). Role of GluK1 kainate receptors in seizures, epileptic discharges, and epileptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 34(17), 5765-5775. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5307-13.2014

García, R., Hernández, E., Concha, A., Pérez, C. A., García, L. I., Hernández, M. E., & Manzo, J. (2009). The cerebellum and its functions. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 9(1), 24-30.

Garey, L. J., Von Bussmann, K. A., & Hirsch, S. R. (2006). Decreased numerical density of kainate receptor-positive neurons in the orbitofrontal cortex of chronic schizophrenics. *Experimental brain research*, 173(2), 234-242. DOI:10.1007/s00221-006-0396-8

Ghasemzadeh, M. B., Sharma, S., Surmeier, D. J., Eberwine, J. H., & Chesselet, M. F. (1996). Multiplicity of glutamate receptor subunits in single striatal neurons: an RNA amplification study. *Molecular pharmacology*, 49(5), 852-859.

- Harrison, P. J., Barton, A. J., Najlerahim, A., & Pearson, R. C. (1990). Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuroreport*, 1(2), 149-152.
- Hassel, B., & Dingledine, R. (2012). Glutamate and glutamate receptors. In *Basic Neurochemistry* (pp. 342-366). *Academic Press*.
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*, 8(4), 775-785. DOI:10.1016/0896-6273(92)90098-x
- Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 89(5), 183-195. DOI: 10.2183/pjab.89.183
- Hollmann, M., Hartley, M., & Heinemann, S. (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252(5007), 851-853.
- Howe, J. R. (1996). Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *Journal of Neurophysiology*, 76(1), 510-519. DOI: 10.1152/jn.1996.76.1.510
- Huettner, J. E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in neurobiology*, 70(5), 387-407.
- Huettner, J. E., Stack, E., & Wilding, T. J. (1998). Antagonism of neuronal kainate receptors by lanthanum and gadolinium. *Neuropharmacology*, 37(10-11), 1239-1247. DOI: 10.1016/S0028-3908(98)00082-3
- Incontro, S. (2013). Expresión y regulación de los receptores AMPA en neuronas granulares de cerebelo (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Ito, M. (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiological reviews*, 81(3), 1143-1195. DOI: doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1143

- Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., Philippe, A., Fellous, M., Giros, B., & Bourgeron, T. (2002). Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Molecular psychiatry*, 7(3), 302-310. DOI: 10.1038/sj.mp.4000979
- Jane, D. E., Lodge, D., & Collingridge, G. L. (2009). Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology*, 56(1), 90-113. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.023
- Ji, Z., & Stäubli, U. (2002). Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neuroscience letters*, 331(2), 71-74. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)00865-0
- Jonas, P., & Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*, 15(5), 987-990.
- Jones, K. A., Wilding, T. J., Huettner, J. E., & Costa, A. M. (1997). Desensitization of kainate receptors by kainate, glutamate and diastereomers of 4-methylglutamate. *Neuropharmacology*, 36(6), 853-863. DOI: 10.1016/S0028-3908(97)00066-X
- Jouhanneau, J. S., Ball, S. M., Molnár, E., & Isaac, J. T. (2011). Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology*, 60(6), 832-841. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.023
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (1998). Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 509(3), 833-845. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.833bm.x
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (2000). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *The Journal of Physiology*, 523(Pt 3), 653. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00653.x
- Kamiya, H., Ozawa, S., & Manabe, T. (2002). Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca²⁺ influx at the hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9237-9243. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09237.2002

- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2014). *Princípios de neurociências-5. AMGH Editora.*
- Kask, K., Zamanillo, D., Rozov, A., Burnashev, N., Sprengel, R., & Seeburg, P. H. (1998). The AMPA receptor subunit GluR-B in its Q/R site-unedited form is not essential for brain development and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13777-13782.
- Köhr, G., Eckardt, S., Lüddens, H., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (1994). NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron*, 12(5), 1031-1040.
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1993). Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*, 10(3), 491-500. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90336-P
- Komuro, H., & Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260(5104), 95-97. DOI: 10.1126/science.8096653
- Korf, J., & Postema, F. (1984). Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *Journal of neurochemistry*, 43(4), 1052-1060. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb12843.x
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2001a). A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, 32(4), 697-709. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00511-6
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., & Collingridge, G. L. (2003). A role for Ca²⁺ stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*, 39(2), 327-341. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00369-6
- Lauri, S. E., Delany, C., Clarke, V. R., Bortolotto, Z. A., Ornstein, P. L., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2001b). Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology*, 41(8), 907-915. DOI: 10.1016/S0028-3908(01)00152-6

- Lester, R. A., Clements, J. D., Westbrook, G. L., & Jahr, C. E. (1990). Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*, 346(6284), 565-567.
- Li, J. M., Zeng, Y. J., Peng, F., Li, L., Yang, T. H., Hong, Z., ... & Zhou, D. (2010). Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions. *Brain research*, 1311, 166-174. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.024
- López-Antúnez M. (2000). Anatomía funcional del sistema nervioso. *México, Limusa*, 2000; 437-465.
- Luquin, M. R., Saldise, L., Guillén, J., Belzunegui, S., San Sebastián, W., Izal, A., & Vázquez, M. (2006). Does increased excitatory drive from the subthalamic nucleus contribute to dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease? *Experimental neurology*, 201(2), 407-415.
- Lynch, D. R., & Guttman, R. P. (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Current drug targets*, 2(3), 215-231. DOI:10.2174/1389450013348434
- Madden, D. R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 91-101.
- MacDonald, M. E., Vonsattel, J. P., Shrinidhi, J., Couropmitree, N. N., Cupples, L. A., Bird, E. D., & Myers, R. H. (1999). Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology*, 53(6), 1330-1330. DOI:10.1212/WNL.53.6.1330
- Maiti, A., Salles, K. S., Grassi, S., & Abood, L. G. (1986). Behavior and receptor changes after kainate lesioning of nodular cerebellum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 25(3), 589-594. . DOI: 10.1016/0091-3057(86)90146-2

- Malinow, R., & Malenka, R. C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*, 25(1), 103-126. DOI: doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758
- Manabe, T., Wyllie, D. J., Perkel, D. J., & Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 70(4), 1451-1459. DOI: 10.1152/jn.1993.70.4.1451
- Matute, C. (1998). Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 10229-10234. DOI: 10.1073/pnas.95.17.10229
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-540.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354(6348), 31-37.
- Motazacker, M. M., Rost, B. R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., & Tzschach, A. (2007). A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 792-798. DOI:10.1086/521275
- Mulle, C., Sailer, A., Pérez-Otaño, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P. E., Bureau, I., & Heinemann, S. F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, 392(6676), 601-605.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G. T., Brana, C., O'Gorman, S., Bettler, B., & Heinemann, S. F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron*, 28(2), 475-484. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)00126-4
- Nadler, J. V., Perry, B. W., & Cotman, C. W. (1978). Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 271(5646), 676-677.

- Negrete-Díaz, J. V., Duque-Feria, P., Andrade-Talavera, Y., Carrión, M., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2012). Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *Journal of neurochemistry*, 121(1), 36-43. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07665.x
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., & Rodríguez-Moreno, A. (2006). Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 96(4), 1829-1837. DOI: 10.1152/jn.00280.2006
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., & Rodríguez-Moreno, A. (2007). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Journal of Neural Transmission*, 114(11), 1425-1431. DOI: 10.1007/s00702-007-0750-4
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 128. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00128
- Nicoll, R. A., Tomita, S., & Brecht, D. S. (2006). Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science*, 311(5765), 1253-1256
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 295-322. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- Nowak, L. P. P. A. A., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462-465.
- O'Neill, M. J., Bogaert, L., Hicks, C. A., Bond, A., Ward, M. A., Ebinger, G. & Lodge, D. (2000). LY377770, a novel iGlu5 kainate receptor antagonist with neuroprotective effects in global and focal cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*, 39(9), 1575-1588. DOI: 10.1016/S0028-3908(99)00250-6

- Paarmann, I., Frermann, D., Keller, B. U., & Hollmann, M. (2000). Expression of 15 glutamate receptor subunits and various splice variants in tissue slices and single neurons of brainstem nuclei and potential functional implications. *Journal of neurochemistry*, 74(4), 1335-1345. DOI: doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741335.x
- Pemberton, K. E., Belcher, S. M., Ripellino, J. A., & Howe, J. R. (1998). High-affinity kainate-type ion channels in rat cerebellar granule cells. *The Journal of Physiology*, 510(2), 401-420. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.401bk.x
- Peret, A., Christie, L. A., Ouedraogo, D. W., Gorlewicz, A., Epsztein, J., Mulle, C., & Crépel, V. (2014). Contribution of aberrant GluK2-containing kainate receptors to chronic seizures in temporal lobe epilepsy. *Cell reports*, 8(2), 347-354. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.032
- Perkinton, M. S., & Sihra, T. S. (1999). A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*, 90(4), 1281-1292.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., & Wenthold, R. J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *Journal of Comparative Neurology*, 349(1), 85-110. . DOI: 10.1002/cne.903490107
- Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J. R., ... & Mulle, C. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12181-12186. DOI: 10.1073/pnas.0608891104
- Pickard, B. S., Malloy, M. P., Christoforou, A., Thomson, P. A., Evans, K. L., Morris, S. W., & Muir, W. J. (2006). Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular psychiatry*, 11(9), 847-857. DOI: 10.1038/sj.mp.4001867

- Rabacchi, S., Bailly, Y., Delhay-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1992). Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*, 256(5065), 1823-1825. DOI: 10.1126/science.1352066
- Reeve, J. E., Kohl, M. M., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., & Anderson, H. L. (2012). Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Communicative & integrative biology*, 5(3), 240-242. DOI: 10.4161/cib.19400
- Rodríguez, F., Broglio, C., & Durán, E. (2000). Fundamentos de neurociencia: manual de laboratorio. *McGraw-Hill España*.
- Rodríguez Moreno, A., Banerjee, A., & Paulsen, O. (2010). Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent long-term depression at cortical synapses. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 2, 18. DOI: 10.3389/fnsyn.2010.00018
- Rodríguez-Moreno, A., Gonzalez-Rueda, A., Banerjee, A., Upton, A. L., Craig, M. T., & Paulsen, O. (2013). Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron*, 77(1), 35-42. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.10.035
- Rodríguez-Moreno, A., Herreras, O., & Lerma, J. (1997). Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*, 19(4), 893-901.
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., Eaton, T. R., Collins, H. A., Anderson, H. L., & Paulsen, O. (2011). Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *Journal of Neuroscience*, 31(23), 8564-8569. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0274-11.2011
- Rodríguez-Moreno, A., & Lerma, J. (1998). Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*, 20(6), 1211-1218. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80501-2
- Rodríguez-Moreno, A., López-García, J. C., & Lerma, J. (2000). Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1293-1298. DOI: 10.1073/pnas.97.3.1293

- Rodríguez-Moreno, A., & Paulsen, O. (2008). Spike timing–dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience*, 11(7), 744-745.
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2004). Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 557(3), 733-745. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.065029
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2007a). Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends in neurosciences*, 30(12), 630-637. DOI: 10.1016/j.tins.2007.10.001
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2007b). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *Journal of neurochemistry*, 103(6), 2121-2135. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca²⁺–calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS letters*, 587(6), 788-792. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.071
- Rodríguez-Moreno, A., & Sihra, T. S. (2011). Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. In *Kainate Receptors* (pp. 39-48). Springer, Boston, MA.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., & Stevens, C. F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, 280(5369), 1596-1599. DOI: 10.1126/science.280.5369.1596
- Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Chiano, M., Dodge, A., Norbury, G., Rosser, E., & Craufurd, D. (1997). Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3872-3876. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3872
- Sánchez-Gómez, M. V., & Matute, C. (1999). AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiology of disease*, 6(6), 475-485. DOI:10.1006/nbdi.1999.0264

- Sander, T., Hildmann, T., Kretz, R., Fürst, R., Sailer, U., Bauer, G., & Janz, D. (1997). Allelic association of juvenile absence epilepsy with a GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) polymorphism. *American journal of medical genetics*, 74(4), 416-421.
- Savidge, J. R., Bleakman, D., & Bristow, D. R. (1997). Identification of kainate receptor-mediated intracellular calcium increases in cultured rat cerebellar granule cells. *Journal of neurochemistry*, 69(4), 1763-1766. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69041763.x
- Schiffer, H. H., & Heinemann, S. F. (2007). Association of the human kainate receptor GluR7 gene (GRIK3) with recurrent major depressive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144(1), 20-26. DOI: 10.1002/ajmg.b.30374
- Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, 291(5510), 1972-1976. DOI: 10.1126/science.1057105
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., & Rusakov, D. A. (2008). Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca²⁺-store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 28(49), 13139-13149. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2932-08.2008
- Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2014). Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *The Neuroscientist*, 20(1), 29-43. DOI: 10.1177/1073858413478196
- Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2011). Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. In *Kainate Receptors* (pp. 1-10). Springer, Boston, MA.
- Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: mechanisms. *Neurochemistry international*, 62(7), 982-987. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.03.012
- Sloviter, R. S., & Damiano, B. P. (1981). On the relationship between kainic acid-induced epileptiform activity and hippocampal neuronal damage. *Neuropharmacology*, 20(11), 1003-1011. DOI: 10.1016/0028-3908(81)90088-5

- Smith, T. C., Wang, L. Y., & Howe, J. R. (1999). Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *The Journal of Physiology*, 517(1), 51-58. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.0051z.x
- Smolders, I., Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Warre, R., Khan, G. M., O'Neill, M. J., & Stables, J. P. (2002). Antagonists of GLU K5-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nature neuroscience*, 5(8), 796-804.
- Sommer, B., Burnashev, N., Verdoorn, T. A., Keinänen, K., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *The EMBO journal*, 11(4), 1651-1656.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., Seeburg, P. H. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249:1580-1585.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., & Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*, 67(1), 11-19. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90568-J
- Somogyi, P., Eshhar, N., Teichberg, V. I., & Roberts, J. D. B. (1990). Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neuroscience*, 35(1), 9-30.
- Spiliopoulos, K., Fragioudaki, K., Giompres, P., Kouvelas, E., & Mitsacos, A. (2009). Expression of GluR6 kainate receptor subunit in granular layer of weaver mouse cerebellum. *Journal of neural transmission*, 116(4), 417-422. DOI: 10.1007/s00702-009-0199-8
- Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J., & Heinemann, S. F. (1994). Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, 13(6), 1345-1357. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90420-0
- Sucher, N. J., & Lipton, S. A. (1991). Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: Regulation by oxidized glutathione. *Journal of neuroscience research*, 30(3), 582-591.

- Swanson, G. T. (2009). Targeting AMPA and kainate receptors in neurological disease: therapies on the horizon? *Neuropsychopharmacology*, 34(1), 249.
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., & Cull-Candy, S. G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *The Journal of Physiology*, 492(1), 129-142. DOI: doi.org/10.1113/jphysiol. 1996.sp021295
- Swanson, G. T., Kamboj, S. K., & Cull-Candy, S. G. (1997). Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 58-69.
- Taverna, F. A., Wang, L. Y., MacDonald, J. F., & Hampson, D. R. (1994). A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), 14159-14164.
- Tekkök, S. B., & Goldberg, M. P. (2001). AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *Journal of Neuroscience*, 21(12), 4237-4248. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04237.2001
- Tong, Z. Y., Overton, P. G., & Clark, D. (1996). Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/kainate receptors blocks bursting in dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex. *Journal of neural transmission*, 103(8-9), 889-904.
- Traynelis, S. F., & Wahl, P. (1997). Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *The Journal of Physiology*, 503(3), 513-531. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1997.513bg.x
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., & Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*, 62(3), 405-496. DOI: 10.1124/pr.109.002451
- Tyrrell, T., & Willshaw, D. (1992). Cerebellar cortex: its simulation and the relevance of Marr's theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 336(1277), 239-257. DOI: 10.1098/rstb.1992.0059

- Verdoorn, T. A., Johansen, T. H., Drejer, J., & Nielsen, E. Ø. (1994). Selective block of recombinant glur6 receptors by NS-102, a novel non-NMDA receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 269(1), 43-49. DOI: 10.1016/0922-4106(94)90024-8
- Vignes, M., & Collingridge, G. L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature*, 388(6638), 179-182.
- Voogd, J., & Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends in cognitive sciences*, 2(9), 307-313. DOI: 10.1016/S1364-6613(98)01210-8
- Wadiche, J. I., & Jahr, C. E. (2001). Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron*, 32(2), 301-313. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00488-3
- Wagster, M. V., Hedreen, J. C., Peyser, C. E., Folstein, S. E., & Ross, C. A. (1994). Selective loss of [3H] kainic acid and [3H] AMPA binding in layer VI of frontal cortex in Huntington's disease. *Experimental neurology*, 127(1), 70-75. DOI: 10.1006/exnr.1994.1081
- Wang, H., & Storm, D. R. (2003). Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Molecular pharmacology*, 63(3), 463-468.
- Weimin P, Zhen H, Congzhou W, Yan H, Jae SP, and Li N. (2009) Flip and Flop: A Molecular Determinant for AMPA Receptor Channel Opening. *Biochemistry*. 48: 3767–3777. DOI: 10.1021/bi8015907
- Werner, P., Voigt, M., Keinänen, K., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1991). Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*, 351(6329), 742-744.
- Westbrook, G. L., & Mayer, M. L. (1987). Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, 328(6131), 640-643.
- Wilson, G. M., Flibotte, S., Chopra, V., Melnyk, B. L., Honer, W. G., & Holt, R. A. (2006). DNA copy-number analysis in bipolar disorder and schizophrenia reveals aberrations in genes

involved in glutamate signaling. *Human molecular genetics*, 15(5), 743-749. DOI: 10.1093/hmg/ddi489

Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., ... & Storm, D. R. (1999). Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*, 23(4), 787-798. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)80036-2

Yamaguchi, T., Hayashi, K., Murakami, H., Maruyama, S., & Yamaguchi, M. (1984). Distribution and characterization of the glutamate receptors in the CNS of ataxic mutant mouse. *Neurochemical research*, 9(4), 497-505. DOI: 10.1007/BF00964376

Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-1094. DOI: [10.1016/j.neuropharm.2008.07.046](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.046)

Xu, J., Liu, Y., & Zhang, G. Y. (2008). Neuroprotection of GluR5-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by Src kinase. *Journal of biological chemistry*, 283(43), 29355-29366.

Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J. (2012). Two-stage AMPA receptor trafficking in classical conditioning and selective role for glutamate receptor subunit 4 (tGluA4) flop splice variant. *J. Neurophysiol.* 108: 101-111.

8. ANEXOS



Cerebellar Kainate Receptor-Mediated Facilitation of Glutamate Release Requires Ca^{2+} -Calmodulin and PKA

Rafael Falcón-Moya¹, Pilar Losada-Ruiz¹, Talvinder S. Sihra²
and Antonio Rodríguez-Moreno^{1*}

¹Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain, ²Department of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, University College London, London, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Inmaculada M. Gonzalez-Gonzalez,
University of Central Lancashire,
United Kingdom

Reviewed by:

James P. Clement,
Jawaharlal Nehru Centre for
Advanced Scientific Research, India
Elek Molnar,
University of Bristol, United Kingdom

*Correspondence:

Antonio Rodríguez-Moreno
arodmor@upo.es

Received: 17 March 2018

Accepted: 16 May 2018

Published: 06 June 2018

Citation:

Falcón-Moya R, Losada-Ruiz P,
Sihra TS and Rodríguez-Moreno A
(2018) Cerebellar Kainate
Receptor-Mediated Facilitation of
Glutamate Release Requires
 Ca^{2+} -Calmodulin and PKA.
Front. Mol. Neurosci. 11:195.
doi: 10.3389/fnmol.2018.00195

We elucidated the mechanisms underlying the kainate receptor (KAR)-mediated facilitatory modulation of synaptic transmission in the cerebellum. In cerebellar slices, KA (3 μM) increased the amplitude of evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) at synapses between axon terminals of parallel fibers (PF) and Purkinje neurons. KA-mediated facilitation was antagonized by NBQX under condition where AMPA receptors were previously antagonized. Inhibition of protein kinase A (PKA) suppressed the effect of KA on glutamate release, which was also obviated by the prior stimulation of adenylyl cyclase (AC). KAR-mediated facilitation of synaptic transmission was prevented by blocking Ca^{2+} permeant KARs using philanthotoxin. Furthermore, depletion of intracellular Ca^{2+} stores by thapsigargin, or inhibition of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release by ryanodine, abrogated the synaptic facilitation by KA. Thus, the KA-mediated modulation was conditional on extracellular Ca^{2+} entry through Ca^{2+} -permeable KARs, as well as and mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores. Finally, KAR-mediated facilitation was sensitive to calmodulin inhibitors, W-7 and calmidazolium, indicating that the increased cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ sustaining KAR-mediated facilitation of synaptic transmission operates through a downstream Ca^{2+} /calmodulin coupling. We conclude that, at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses, presynaptic KARs mediate glutamate release facilitation, and thereby enhance synaptic transmission through Ca^{2+} -calmodulin dependent activation of adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase A signaling.

Keywords: kainate receptors, glutamate, presynaptic, Ca^{2+} -calmodulin, PKA, slices

INTRODUCTION

Kainate-type glutamate receptors are well established mediators of canonical, ionotropic postsynaptic synaptic transmission and, presynaptically, the receptors support a modulatory regulation of neurotransmitter release. In the latter regard, kainate receptors (KARs) evince a non-canonical metabotropic capacity, through which they effect the control of both glutamate and GABA release (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b; Jane et al., 2009; Shira and Rodríguez-Moreno, 2013; Valbuena and Lerma, 2016).

At several excitatory glutamatergic synapses, the KAR-mediated modulation is found to be biphasic, such that low agonist concentrations facilitate glutamate release, as opposed to higher agonist concentrations, which inhibit neurotransmitter release (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013). How this diametrically opposite modulation is mechanistically manifest is subject of considerable debate and investigation, as is the question of the subcellular location of KARs responsible for presynaptic modulation (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013).

KARs are expressed in the cerebellar cortex in the axons of cerebellar granule cells that form parallel fibers (PF), and make excitatory synapses with Purkinje cells (PuC, Smith et al., 1999). Messenger RNA transcripts encoding for different KAR subunits (GluK1, GluK2 and GluK5) have been detected in granule cells and functional expression of KAR subtypes has been reported (Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Bahn et al., 1994; Petralia et al., 1994). The subunits GluK1 and GluK2 have been detected on parallel fibers, Petralia et al., 1994). Biophysical studies with single-channel recordings have shown GluK1 activity (Swanson et al., 1996), suggesting these KARs are Ca^{2+} -permeable. A biphasic action of KARs, activated by the agonist domoate, has been shown previously at PF-PuC synapse, with low agonist concentrations facilitating synaptic transmission, and higher concentrations depressing synaptic transmission (Delaney and Jahr, 2002). However, the precise mechanism of action by which KARs mediate potentiation (and depression) of synaptic transmission at PF-PuC synapses is completely unknown. Here, we have examined the mechanism underpinning the facilitatory effect of KA in cerebellar slices at synapses between granule cell terminals and Purkinje cells.

First, establishing mechanistic features of the modulation, we found that the KAR-mediated facilitation of glutamate release and synaptic transmission has an obligatory dependency on adenylyl cyclase (AC) and cAMP-mediated protein kinase A (PKA) activity. Furthermore, the KAR-mediated modulation of transmission is reliant on both external Ca^{2+} entry via Ca^{2+} -permeant KARs, and functional intracellular Ca^{2+} -stores. Finally, obviation of facilitation by calmodulin inhibition invokes a mechanistic coupling of KARs through Ca^{2+} -calmodulin/AC/cAMP/PKA signaling, at PF-PuC synapses in the cerebellum.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiments were performed on 4–6 week old C57Bl/6 male mice obtained from Harlan Laboratories (Spain). Experiments were conducted in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals in acute experiments and were approved by the local Ethical Committee (Junta de Andalucía and University Pablo de Olavide, Sevilla, Spain).

Slice Preparation

Cerebellar parasagittal slices were prepared. Briefly, after decapitation, the whole brain was removed under ice-cold buffered salt solution consisting of (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH_2PO_4 , 2 MgSO_4 , 1.8 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , and 10 glucose (pH 7.2, 300 mOsm), and positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica 1000S), and cut to obtain cerebellar slices (350 μm thick) containing parallel fibers-Purkinje cells synapses. Slices were maintained continuously oxygenated for at least 1 h before use. All experiments were carried out at room temperature (22–25°C). During experiments, slices were continuously perfused with buffered salt solution as detailed above.

Electrophysiological Recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were made from Purkinje neurons. NMDA receptor-mediated evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) were recorded at +40 mV from these neurons visually identified by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) microscopy using a 40 \times water immersion objective. Perfusion solution contained GYKI53655 (30 μM), to block AMPA receptors, and bicuculline (10 μM), to block GABA_A receptors. In experiments involving AMPA receptor-mediated currents, performed at –70 mV, no GYKI53655 was used, but D-AP5 (50 μM) was included to block NMDA receptors. To evoke eEPSCs, electrical pulses were delivered to granule cells axons (parallel fibers) using a monopolar electrode placed in the molecular layer at a frequency of 0.2 Hz. Patch electrodes were made from borosilicate glass and had a resistance of 4–7 M Ω when filled with (mM): 120 CsCl, 8 NaCl, 1 MgCl_2 , 0.2 CaCl_2 , 10 HEPES, 2 EGTA and 20 QX-314 (pH 7.2, 290 mOsm). A 40 ms paired-pulse stimulation protocol was used for pair pulse ratio (PPR) analysis. Neurons were voltage clamped, using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Access resistance was regularly monitored during recordings, and cells were rejected if it changed >15% during the experiment. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a computer using pClamp software (Molecular Devices). Synaptic failures were identified as the lack of synaptic responses after presynaptic stimulation with the amplitude of these responses being no different from basal noise amplitude.

Data Analysis

Data were normalized taking the control as 100% of the response and presented as means \pm SEM. Signals were averaged every 12 traces. Effects of KA were measured at peak (maximum) compared to averaged 10 min baseline points. Significance was assessed at $P < 0.05$. Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t*-test for comparison of two data sets and ANOVA for comparison of multiple data set using the Bonferroni as a *post hoc* test.

Compounds

Salts and general reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); GYKI 53655, D-AP5, NBQX, bicuculline,

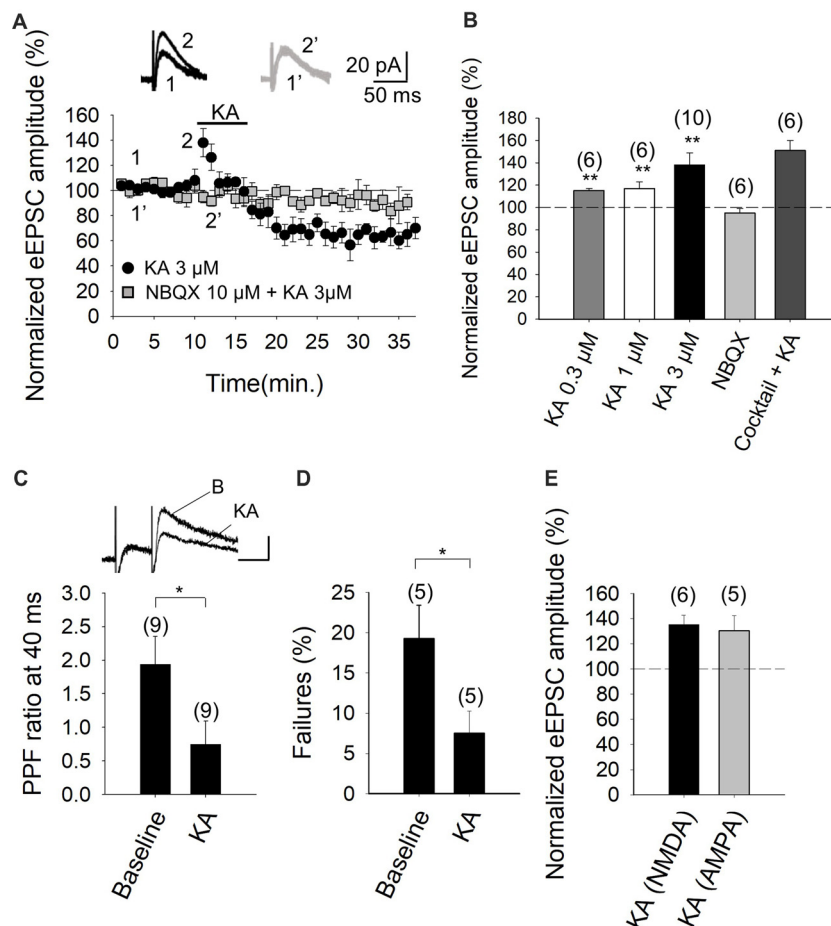


FIGURE 1 | Kainate (KA) increases the evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) amplitude at parallel fibers-Purkinje cells (PF-PuC) synapses of the cerebellum. **(A)** Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in the absence (circles) and presence of NBQX (squares). Inset show traces before and after 4 min KA perfusion in the absence (1, 2) and in the presence of 10 μM NBQX (1', 2'). **(B)** Quantification of modulation observed in **(A)** and dose dependency. **(C)** KA (3 μM) perfusion produces a decrease of the paired pulse ratio, inset shows scaled representative traces. **(D)** Effect of KA on the number of failures of NMDA receptor-mediated currents. **(E)** Effect of KA (3 μM) on NMDA and AMPA receptor-mediated currents, respectively. Note that the effect of kainate on these currents is indistinguishable. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means ± SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Student's t -test).

Rp-Br-cAMP, H-89, forskolin, philanthotoxin, ryanodine, thapsigargin, kainate, Pertussis toxin CMZ and W-7 were obtained from Tocris (Bristol, UK).

RESULTS

The Activation of Kainate Receptors By 3 μM KA Produces an Increase in the Amplitude of NMDA-Evoked Postsynaptic Currents at PF-PuC Synapses

Following the observation that glutamatergic transmission at PF-PuC synapses of juvenile rats pups is modulated by KARs in a biphasic manner (Delaney and Jahr, 2002), as is also the case in the hippocampus (for review see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b, 2013; Lerma and Marques, 2013), we established

the parallel fiber-Purkinje (PF-PuC) synapse paradigm in slices from early adult mouse cerebellum.

The experimental paradigm we used was the stimulation of parallel fiber axons while measuring NMDA receptor-mediated eEPSCs in PuCs, by whole-cell patch clamp recordings, with the membrane potential held at +40 mV. Recording were made in the presence of 30 μM GYKI53655, in order to obviate AMPA receptor activation, as well as the presence of 10 μM bicuculline, to antagonize GABA_A receptors. In our experiments, young adult cerebellar synapses evince detectable facilitation of NMDA receptor-mediated eEPSC amplitudes at 3 μM KA ($138 \pm 11\%$, $n = 10$, **Figures 1A,B**), with 0.3 μM and 1 μM agonist concentrations having smaller effects ($115 \pm 2\%$, $n = 6$, $117 \pm 6\%$, $n = 6$, respectively). With 3 μM KA, synaptic facilitation was followed by a $36 \pm 8\%$ (to $64 \pm 8\%$ of baseline, $n = 10$) decrease in the eEPSC amplitude (**Figure 1B**). To analyze the mechanistic details of the KAR-mediated facilitation

of glutamatergic transmission, we hereafter utilized 3 μ M KA in subsequent electrophysiological experiments as 3 μ M KA produced the maximum level of facilitation observable (**Figures 1A,B**).

To determine whether the effect of KA recorded from Purkinje neurons in slices was mediated by the activation of KARs, analogous to that observed in other brain regions, such as the hippocampus and cortex (Lauri et al., 2001a,b, 2003; Schmitz et al., 2001; Ji and Stäubli, 2002; Contractor et al., 2003; Breustedt and Schmitz, 2004; Rodríguez-Moreno and Sihra, 2004, 2013; Campbell et al., 2007; Pinheiro et al., 2007; Scott et al., 2008; Fernandes et al., 2009; Jouhanneau et al., 2011; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), we performed experiments in the presence of NBQX. We showed that the 3 μ M KA biphasic effect on the eEPSC amplitude was abolished in the presence of 10 μ M NBQX ($95 \pm 4\%$, $n = 6$, **Figures 1A,B**). In these experiments, because AMPA receptors are antagonized in the presence of the selective blocker GYKI53655 in the bath, the observation of full antagonism by NBQX invokes the modulation to be due to KARs specifically. Further, in line with the notion that the facilitation (and the depression) of synaptic transmission observed is exclusively contingent on KAR activation. KA-mediated facilitation was retained ($151 \pm 9\%$ increase of eEPSCs amplitude, $n = 6$) when other transmitter influences were obviated by the inclusion of a cocktail of inhibitors including the receptor antagonists: MCPG and MPPG (1.5 mM), naloxone (100 μ M), bicuculline (20 μ M), 2-OH-saclofen (150 μ M), atropine sulfate (50 μ M) and DPCPX (0.1 μ M), to block metabotropic glutamate, opioid, GABA_A, GABA_B, muscarinic and adenosine receptors, respectively. Indeed, the synaptic depression that followed the facilitation of eEPSCs, was also present in the presence of the inhibitor cocktail (to $65 \pm 8\%$ of the baseline, $n = 6$). These data therefore exclude the possibility that KA-mediated modulation was a secondary consequence of the synaptic release of diverse neurotransmitters, but rather, support the hypothesis that a direct effect of KA on KARs at cerebellar synapses underpins the observed modulation.

Previously, the facilitatory action of KA at the PF-PuC synapses have been attributed to presynaptic regulation (Delaney and Jahr, 2002). In our studies, we confirmed a presynaptic locus of action by using several approaches. First, we performed paired-pulse recordings and measured the paired-pulse ratio (PPR; pair-pulse depression was observed at 40 ms pulse interval). PPR was 1.9 ± 0.4 ($n = 9$) under control/baseline conditions. After KA treatment, PPR decreased to 0.7 ± 0.3 ($n = 9$; **Figure 1C**), implying an effect on release probability (Manabe et al., 1993), thereby corroborating the presynaptic origin of the KA receptor-mediated regulation. Second, we determined the proportion of synaptic failures in presence of KA. Under control conditions, synaptic failure rate was $19 \pm 4\%$, $n = 5$. Following the application of KA, the failure rate was measurably decreased (to $7 \pm 3\%$, $n = 5$, **Figure 1D**), again indicating a presynaptic locus of KA action. Finally, we compared the KA-mediated modulation of NMDA receptor-mediated eEPSCs (with GYKI53655 present) and

AMPA receptor-mediated eEPSCs recorded at -70 mV (without GYKI53655, but with D-AP5 and bicuculline, to respectively block NMDA and GABA_A receptors). KA mediated a comparable increase in the NMDA receptor-mediated eEPSCs ($135 \pm 7\%$, $n = 6$, **Figure 1E**) and the AMPA receptor-mediated eEPSCs ($130 \pm 12\%$, $n = 5$, **Figure 1E**). This congruent facilitation of NMDA and AMPA receptor-mediated eEPSC amplitudes intimates that KA-modulation acts upstream of postsynaptic receptor activation, i.e., at the level of presynaptic terminal, through increased glutamate release. Together the preceding evaluation reliably evinces a presynaptic locus of action of KA at the PF-PuC synapses under investigation. However, it remains to be seen where the respondent KARs are physically located i.e., terminal, axonal or somatodendritic presynaptic compartments.

KAR-Mediated Facilitation of Glutamatergic Transmission at PF-PuC Is Contingent on cAMP-Dependent Signaling

With the selectivity of the action of KA verified, in subsequent experiments we examined the second messenger system that mediates the facilitation of eEPSCs. First, we tested whether PKA was involved in the increased eEPSCs, by inhibiting either the cAMP-mediated activation of PKA, or the catalytic activity of the kinase, by respectively treating slices with the inhibitors cAMP-Rp or H-89. With the addition of 100 μ M cAMP-Rp or 2 μ M H-89, the facilitation of the eEPSC amplitude by 3 μ M KA was eliminated ($88 \pm 3\%$, $n = 7$ after cAMP-Rp and $92 \pm 6\%$, $n = 7$ after H-89, vs. KA 3 μ M, $131 \pm 9\%$, $n = 13$ **Figures 2A,B**). cAMP-Rp and H-89 alone produced only small decrements in the eEPSC amplitude ($7 \pm 3\%$ and $10 \pm 4\%$, respectively, $n = 5$, data not shown). The data together point to PKA playing an obligatory part in the observed KA-mediated modulation of PF-PuC cerebellar glutamatergic transmission.

For further corroboration, we next examined the KA-mediated facilitation of eEPSCs in presence of direct AC activation by forskolin. Given that forskolin produces long-lasting effects (Tong et al., 1996), slices were preincubated for 1 h with the diterpene in these experiments. KA application to forskolin (30 μ M)-treated slices failed to alter eEPSC amplitudes ($95 \pm 4\%$, $n = 6$, **Figure 2B**). This observation evinces that the previous AC activation by forskolin, obviates KAR-mediated regulation at PC-PuC synapses. To ensure that the forskolin-mediate abrogation of KAR regulation was indeed due the elevation of cAMP production, rather than a non-specific effect, we used 1,9-dideoxyforskolin, the inactive diterpene analog of forskolin, in control experiments. With dideoxyforskolin (100 μ M) incubation of slices, KA (3 μ M) invoked a facilitation of $42 \pm 5\%$ (to $142 \pm 5\%$ of baseline, $n = 5$) in the amplitude of the eEPSCs, comparable to KA controls. This corroborates that occlusion of the KA receptor-mediated modulation by forskolin can indeed be ascribed to an increase in cAMP levels due to a pharmacological stimulation of AC. In sum, these data support the hypothesis

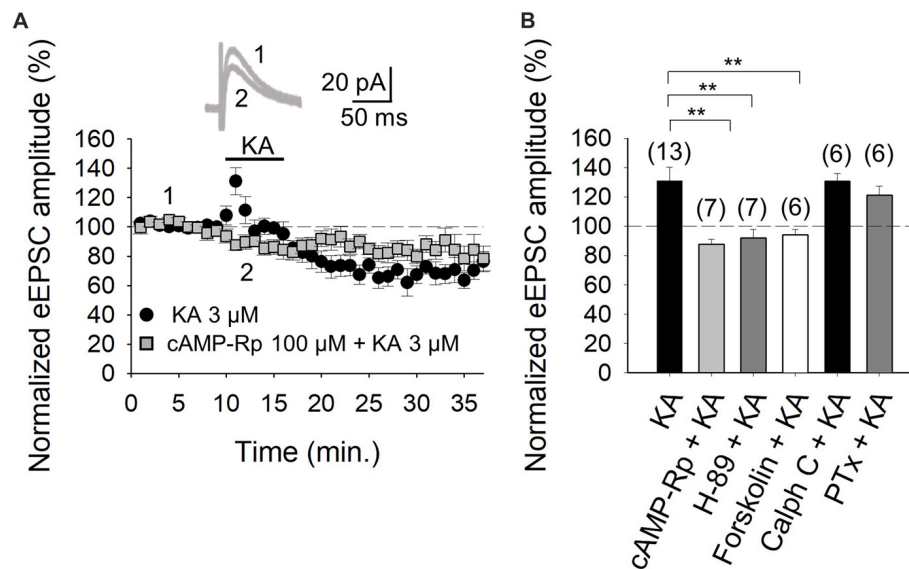


FIGURE 2 | Activation of adenylyl cyclase (AC) and downstream protein kinase A (PKA) underlies the kainate-mediated facilitation of glutamate release in PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in cAMP-Rp treated slices. Inset shows representative traces showing that KA (3 μ M) does not increase the amplitude of the eEPSCs in cAMP-Rp treated slices. **(B)** Inhibition of PKA by cAMP-Rp (100 μ M) or H-89 (2 μ M) and activation of AC by forskolin (30 μ M) prevented the facilitatory action of KA. Inhibition of protein kinase c (PKC) with calphostin C (1 μ M) has no effect on the KA enhancement of the eEPSC amplitude. The facilitatory effect of KA is not affected in slices treated with pertussis toxin. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means \pm SEM (** P < 0.01, ANOVA test).

that forskolin, through an AC/cAMP/PKA pathway, occludes the metabotropic, facilitatory and presynaptic action of KARs at PF-PuC synapses.

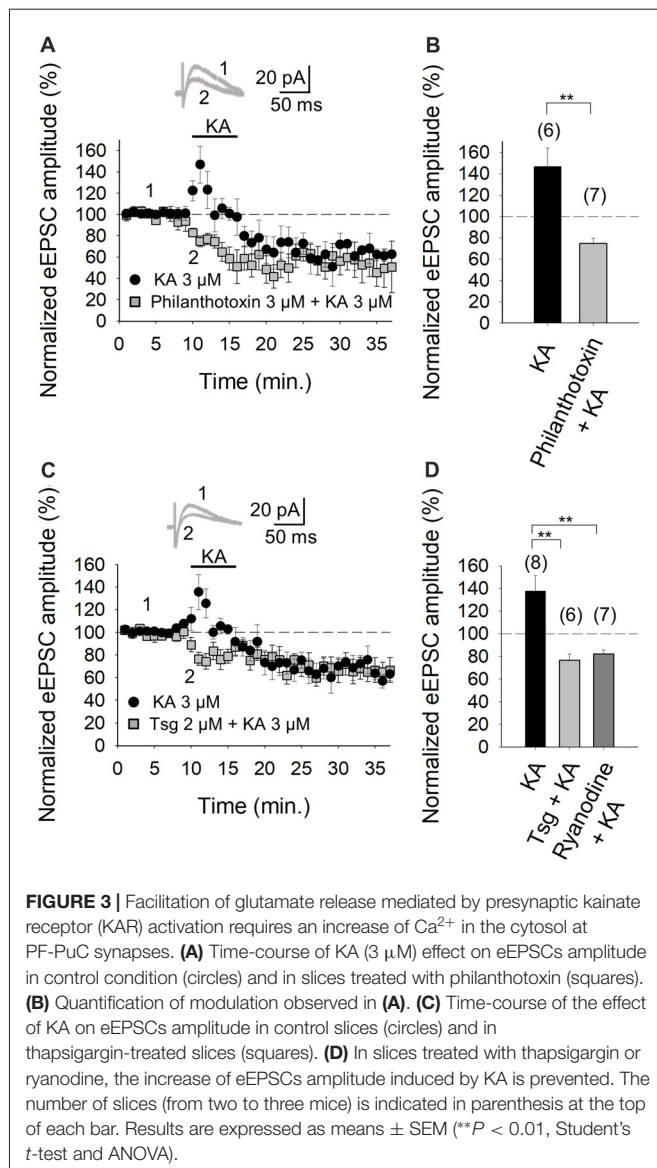
The aforementioned data in **Figure 2** indicate that the KA receptor-mediated facilitation of glutamatergic transmission at these cerebellar PF-PuC synapses is manifest through an AC/cAMP/PKA signaling pathway. However, given that in other slice preparations, protein kinase C (PKC) has also been implicated in aspects of the KAR-mediated modulation (for reviews see Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007a,b), we examined whether this kinase plays a role in the modulation of the PF-PuC cerebellar synapse by KA. In slice experiments using calphostin C (1 μ M) to specifically inhibit PKC, no significant effect on the KA-mediated facilitation was observed ($131 \pm 5\%$, $n = 6$, **Figure 2B**), this result therefore obviating involvement of PKC in the modulation observed.

Next, we determined whether the facilitatory effect of presynaptic KAR activation involves G-protein function, by examining the effect of KA on slices treated with Pertussis toxin (PTx, 5 μ g/ml). Intriguingly, in the presence of PTx, the KAR-mediated facilitation of synaptic transmission was retained, unaffected by G-protein block ($122 \pm 6\%$, $n = 6$, vs. $131 \pm 9\%$, $n = 13$ without PTx, **Figure 2B**). Interestingly, and as an important positive control for the activity of PTx, we found that the inhibitory effect of KA at the same synapse was indeed suppressed by PTx; implying selective G-protein involvement in inhibitory modulation by KAR in the preparation under

study ($90 \pm 8\%$, $n = 6$; vs. control $65 \pm 7\%$, $n = 13$, not shown).

Facilitation of Synaptic Transmission/Glutamate Release at PF-PuC Synapses Is Mediated by a Ca^{2+} Permeant Presynaptic KAR: Contingency on the Mobilization of Intracellular Ca^{2+} Stores and Ca^{2+} /Calmodulin Dependence

The role of Ca^{2+} in mediating KAR-mediated synaptic facilitation has been subject of debate and controversy, for instance, at the hippocampal mossy fiber-CA3 (MF-CA3) synapses. Some studies suggest that permeation of Ca^{2+} through KARs and subsequent Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from intracellular stores is obligatory for short-term and long-term plasticity at MF-CA3 synapses (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Others have registered no effect of KA on cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ (Kamiya et al., 2002) and yet others advocate that a decrement Ca^{2+} concentration underpins the modulation due to KAR activation (Kamiya and Ozawa, 1998, 2000). To examine the former possibility and the presence of Ca^{2+} permeant KARs at these cerebellar synapses, we investigated the effect of KA on the eEPSC amplitudes in the presence of philanthotoxin, a toxin shown to block unedited, Ca^{2+} permeable KARs (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008). After treatment of slices with 3 μ M philanthotoxin, the synaptic facilitation mediated by 3 μ M KA was completely abrogated (to $75 \pm 5\%$ of initial amplitude, $n = 7$ vs. $147 \pm 17\%$,



$n = 6$ observed in interleaved slices, **Figures 3A,B**). These results evince that Ca^{2+} permeation through KAR is essential for the synaptic facilitation observed at PF-PuC synapses. To establish whether the aforementioned Ca^{2+} signal produced by KAR activation required amplification by Ca^{2+} -induced intracellular Ca^{2+} -store mobilization, we examined the effect of KA following depletion of intracellular Ca^{2+} -stores, using thapsigargin to inhibit the SERCA pump responsible for Ca^{2+} accumulation into the stores. Treatment with thapsigargin ($2 \mu\text{M}$) eliminated the facilitatory effect of $3 \mu\text{M}$ KA, and, indeed, rather produced a depression of the response ($77 \pm 5\%$, $n = 6$, with thapsigargin vs. $138 \pm 13\%$, $n = 8$, without thapsigargin, in interleaved slices; **Figures 3C,D**). These data unequivocally demonstrate the mandatory requirement for intracellular Ca^{2+} stores in the modulation elicited by KA. However, the question remains whether KA treatment mobilizes these intracellular Ca^{2+} stores by first triggered an initial rise of cytosolic Ca^{2+}

concentrations due to extracellular Ca^{2+} influx. To answer this, we examined the effect of ryanodine, which selectively inhibits Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (Berridge, 1998), to elucidate whether this underpins KAR-mediated facilitation. Ryanodine ($10 \mu\text{M}$) treatment eliminated the KAR-mediated facilitation of transmission at these PF-PuC synapses ($82 \pm 4\%$, $n = 7$, with ryanodine vs. $138 \pm 13\%$, $n = 7$, without ryanodine, in interleaved slices; **Figure 3D**). Taken together, the foregoing results support the hypothesis that presynaptic KARs at PF-PuC synapses are Ca^{2+} permeable, and that Ca^{2+} entry effected by these KARs and Ca^{2+} channels, triggers Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release from intraterminal Ca^{2+} -stores to produce synaptic facilitation.

It is evident from the foregoing data that an entry of Ca^{2+} via KARs is obligatory for the mediation of the facilitation invoked by KA. Given that in the hippocampus and the cortex, where we have previously examined KAR-mediated modulation, the activation of a Ca^{2+} -calmodulin complex was shown to be mandatory for AC activation (Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), we examined this regulatory pathway at the cerebellar PF-PuC synapse by treating slices with the calmodulin antagonist, W-7, before recording eEPSCs. With W-7 ($25 \mu\text{M}$) present, KA ($3 \mu\text{M}$)-mediated facilitation was convincingly blocked ($86 \pm 3\%$, $n = 6$, with W-7 vs. $136 \pm 13\%$, $n = 8$ without W7, in interleaved slices; **Figures 4A,B**). Corroboration of calmodulin dependence of the modulation, was also evident from experiments performed in the presence of calmidazolium (CMZ, $1 \mu\text{M}$), an alternative calmodulin antagonist. As with W-7, in presence of CMZ, KA ($3 \mu\text{M}$)-mediated facilitation of synaptic transmission was abrogated ($78 \pm 11\%$, $n = 6$, **Figure 4B**). These data support the postulate that a presynaptic Ca^{2+} -calmodulin complex is obligatory for the KAR-mediated synaptic regulation and operates upstream of the activation of AC/cAMP/PKA signaling.

DISCUSSION

The results in this study, utilizing electrophysiological experiments in cerebellar slices, show that the activation of presynaptic KARs in the cerebellum, at PF-PuC synapses, invokes a facilitation of synaptic transmission/glutamate release. Analysis of this modulation suggests a mechanistic coupling of KARs through Ca^{2+} -calmodulin/AC/cAMP/PKA activity, but independently of G-protein activation.

We would hypothesize that the observed KA-mediated enhancement of the eEPSPs at PF-PuC synapses is due to increased glutamate release, which could be monitored by NMDA receptor-mediated currents (with AMPA receptors antagonized by GYKI53655), and blocked by the KAR/AMPA receptor antagonist NBQX. Under conditions where AMPA receptor activation is obviated by GYKI53655, this therefore delineates the specific role of KARs in the facilitatory regulation, particularly given that a receptor antagonist cocktail, formulated to eliminate the presynaptic effects of neurotransmitters that might be secondarily released, also had no effect on the observed synaptic modulation due to KA.

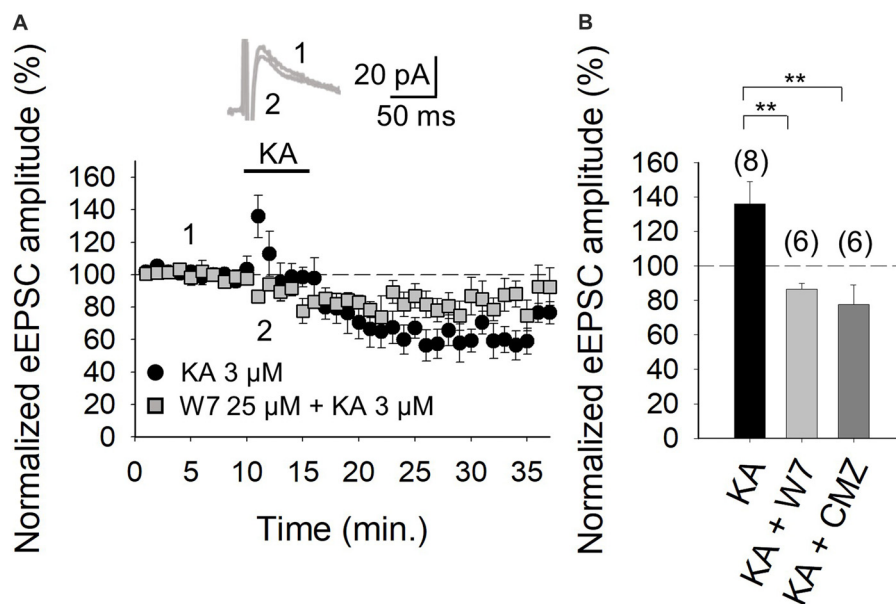


FIGURE 4 | Facilitation of glutamate release mediated by presynaptic KAR activation requires Ca^{2+} -calmodulin at PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in control condition (circles) and in the slices treated with 25 μM W-7 (squares). Inset show traces before and after 4 min KA perfusion from W-7 treated slices. **(B)** Quantification of modulation observed in **(A)** and in the presence of 1 μM CMZ. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parenthesis at the top of each bar. Results are expressed as means \pm SEM (** $P < 0.01$, ANOVA test).

In assessing synaptic regulation, it is indeed of utmost importance to identify the subcellular location of the KAR postulated. We corroborated the presynaptic presence of KARs by electrophysiological analysis of a presynaptically manifest parameter, i.e., the PPR (pair-pulse ratio) of consecutive eEPSCs mediated by neurotransmitter release. A clear decrease in the PPR of eEPSCs observed with KA application in our experiments, suggested a change in release probability (by definition a presynaptic property in synaptic transmission). Secondly, we assessed the proportion of synaptic failures in response to KA application. With KA application, the failure proportion was evidently diminished, supportive of an increase in the probability of presynaptic transmitter release and corroborative of the observed facilitation occurring through KAR activation. Finally, importantly, the effects of KA observed on NMDA and AMPA receptor-mediated currents were similar. Given that no such equivalence would be predicted if the observed modulation was postsynaptic, the data here are supportive of a presynaptic mode of action for KARs being activated. Altogether, three independent analyses mutually corroborate and emphasize a presynaptic locus of action of KARs functioning at PF-PuC synapses.

It remains to be elucidated whether the presynaptic regulation by KA at PF-PuCs reports the activity of KARs subcellularly localized at nerve terminal/axonal or somatodendritic compartments. The technically challenging paradigms needed to address this question is beyond the scope of the present paper. However, to directly elucidate the presynaptic compartmentalization of KARs, future work necessitates: (i) high resolution immunolocalization (immunogold-based)

of the receptor (contingent on the availability of high affinity antibodies with appropriate KAR subunit-specificity); and (ii) targeted blockade of KARs using caged-antagonists (contingent on the pending development of reagents) (see NMDA receptor studies, Rodríguez-Moreno et al., 2011; Reeve et al., 2012).

Corresponding with our previous studies in the hippocampus and cortex (Rodríguez-Moreno and Sihra, 2004, 2013; Andrade-Talavera et al., 2012, 2013), PKA inhibition by the cell-permeant cyclic nucleotide analog cAMP-Rp, also led to the abrogation of KA-mediated enhancement of synaptic transmission/glutamate release at PF-PuC synapses. The congruence of the mechanism between synapses was also highlighted in the current studies, by the observation that the inhibition PKA catalytic activity by H-89 also eliminated the KA-mediated facilitation. Similarly and congruently, direct activation of AC by preincubation with forskolin, produced refractoriness of the facilitatory effect of KA. Collectively, these results consistently suggest that AC/cAMP/PKA signaling underpins the facilitatory modulation of synaptic transmission/glutamate release at the synapse under study here.

Consistently, there has been a notable absence of any evidence to support G-protein mediated initiation/transduction of the AC/cAMP/PKA cascade posited to be involved in presynaptic KAR-mediated enhancement of glutamate release. We therefore addressed the conceivable role of Ca^{2+} as the initiator of a G-protein independent signaling cascade, in the modulation being investigated at defined cerebellar PF-PuC synapses. In the canonical context, KARs may mediate external Ca^{2+} entry through an ionotropic activity which would depolarize nerve

terminals (Perkinton and Sihra, 1999) and thus activate voltage-gated Ca^{2+} channels. Non-canonically, direct Ca^{2+} influx via Ca^{2+} permeable KARs *per se* is also possible (Fletcher and Lodge, 1996; Scott et al., 2008). Notably in the studies reported herein, a blockade of the Ca^{2+} permeable KARs by the selective inhibitor, philanthotoxin, abrogated the KA-mediated synaptic facilitation in the current studies, pointing to a strict requirement for external Ca^{2+} entering via KARs to support facilitatory modulation. Interestingly therefore, it would appear that, although it is thought that unedited Ca^{2+} permeable KARs typically prevail earlier during neuronal development, these receptors evidently persevere with activity in the cerebellum of the early adult, mouse brain.

We extended the analysis of properties of KAR-mediated regulation by examining the hypothesis that the essential core, albeit perhaps limited, Ca^{2+} entry via KARs may be amplified by Ca^{2+} mobilized from intraterminal stores, as reported for similar modulation at hippocampal synapses (Lauri et al., 2003; Scott et al., 2008). Emphatically supporting a critical role for intraterminal Ca^{2+} stores, were our results showing that thapsigargin treatment, to deplete intracellular Ca^{2+} stores (Irving et al., 1992), abolished the facilitatory regulation by KARs. Again, in corroboration of the hypothesis, use of ryanodine to selectively inhibit Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (Berridge, 1998), evinced that Ca^{2+} entry via KARs induces Ca^{2+} mobilization from intraterminal Ca^{2+} stores to invoke the modulation seen herein.

Having demonstrated that Ca^{2+} entering via KARs and subsequent Ca^{2+} increases due to mobilization of intraterminal Ca^{2+} stores is actually obligatory for the KA facilitation of synaptic transmission at PF-PuC synapse, we questioned how might such an increase in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ couple to the postulated AC/cAMP/PKA signaling mediating the facilitation by KARs. From previous studies, it is plausible that the rise in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ activates Ca^{2+} -dependent ACs present in parallel fiber terminals. A number of ACs have been described, however, AC1 and AC8 are two members of the family, that have been shown to be activated by Ca^{2+} -calmodulin and are abundant in the central nervous system (for reviews see Cooper, 2003; Wang and Storm, 2003). Interestingly, supporting their significance to the hypothesis, studies with double knockouts of AC1 and AC8, have shown that the Ca^{2+} -calmodulin ACs are indeed essential for the widely reported Ca^{2+} -dependent elevation of cAMP (Wong et al., 1999). Using the calmodulin antagonists W-7 and CMZ, our data shows that inhibiting Ca^{2+} -calmodulin function, abolishes the presynaptic KAR-mediated modulation in cerebellar slices. This supports the hypothesis that, following KAR activation and elevation of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$, a Ca^{2+} -calmodulin-dependent coupling may activate AC1 and/or AC8, and thereby extend to the initiation of the AC/cAMP/PKA cascade, hence promoting synaptic facilitation through increased neurotransmitter release at PF-PuCs synapses.

This report shows the PF-PuC synapse is a reliable and robust model for the study of KAR mediated modulation. Interestingly, however, we observed a facilitation of synaptic transmission/glutamate release at 3 μM KA, contrary to previous work with the same synapse, where 500 nM agonist induced

a depression in glutamate release (Delaney and Jahr, 2002). The discrepancy may reflect the notably different agonist concentrations employed, and indeed the difference in the age of animals, and perhaps the species of animals used in the previous experiments (Delaney and Jahr, 2002 utilized P13-P17 rats). The higher concentration of KA necessary for the activation of KARs at young adult synapses may indeed be indicative of the different efficacy of KA at KARs at this age, perhaps dependent on the expression of specific glutamate receptor subunit subtypes composing the resident KARs.

From our results, it is clear that KAR function is preserved in early adult animals at PF-PuC synapses and is not temporally limited to the two firsts postnatal weeks as reported previously (Delaney and Jahr, 2002). KARs have an autoreceptor role in developing animals, with the concentration of agonist determining presynaptic modulation: facilitation (at low $[\text{KA}]$) and depression (at high $[\text{KA}]$) and, thereby, putatively determining synapse consolidation and stability. Although the precise role(s) of these KARs in adult animals remains to be explicated, the modulation of presynaptic function reported herein might manifest some forms of plasticity. For instance, KARs have been shown to be involved in plasticity at PF-PuCs synapses (for review see Hirano, 2013; Sihra et al., 2014).

Our experiments here do show that KAR activation has a biphasic effect at PF-PuC synapses as previously reported (Delaney and Jahr, 2002); inducing a depression of glutamate release at relatively high concentrations of KA (>1–3 μM) rather than facilitation. The aim of the current study was to elucidate the mechanistic details of the observed facilitation, rather than the factors underpinning in the synaptic depression. However, notably, our results did reveal that the transient synaptic depression observed with high KA concentrations is abolished in the presence of cAMP-Rp (inhibition of PKA activation), but not affected by any of the experimental manipulations speaking to regulation of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ or function thereof, i.e., philanthotoxin, thapsigargin, W-7 or CMZ. These observations point to the synaptic depression seen likely involving an AC/cAMP/PKA pathway, as described for facilitation, but without the proposed Ca^{2+} -AC coupling. The indications are therefore, that KARs have alternative mechanistic modes for facilitatory and depressive action. Indeed, KAR coupling to an increase in cAMP concentrations (and subsequent enhancement of PKA activity), or to a decrease in cAMP concentrations (and subsequent diminution of PKA activity), has been reported in studies investigating the mossy fiber-CA3 synapse of the hippocampus (Negrete-Díaz et al., 2006, 2007; Andrade-Talavera et al., 2012), the amygdala (Negrete-Díaz et al., 2012) and in the cortex (Andrade-Talavera et al., 2013). The key difference that our current results point to is the differing direction and means of regulation of the AC/cAMP/PKA cascade in the bimodal regulation by KARs. Whereas, presynaptic facilitatory function by KARs evidently involves an increase in AC/cAMP/PKA signaling instigated by the Ca^{2+} -calmodulin complex, KARs appear to be negatively coupled to the AC/cAMP/PKA pathway to effect depression synaptic transmission. Previous studies at MF-CA3 synapses and thalamocortical synapses (and as

confirmed here) have reported that the depression of presynaptic function occurs through a negative coupling to AC/cAMP/PKA and is actually invoked by the action of a PTx sensitive G-protein (Negrete-Díaz et al., 2006; Andrade-Talavera et al., 2013). Notwithstanding the postulated differential upstream coupling to AC to achieve facilitation and depression, it is also plausible that the diametric mechanisms reflect the operation of two distinct types of KARs. Future studies will elucidate the exact instruments involved in the observed KAR-mediated modulation and address the question as to whether different populations of presynaptic KARs reside at the PF-PuC synapse.

In conclusion, our studies show that presynaptic KARs activation by KA, at PF-PuC synapses produces a facilitation of synaptic transmission consistent with an increase in neurotransmitter release. We postulate that, mechanistically, KAR-mediated presynaptic facilitation involves an increase in cytosolic $[Ca^{2+}]$, first by external Ca^{2+} -entry via Ca^{2+} -permeable KARs, and second by this then triggering the

mobilization of intracellular Ca^{2+} from stores in granule cells terminals. The raised Ca^{2+} binds to calmodulin to form a Ca^{2+} -calmodulin complex, which we postulate activates AC1 or AC8 to elevate cAMP levels and thus effect PKA stimulation. The latter invokes an enhancement of glutamate release and hence synaptic transmission at the PF-PuC synapse in the cerebellum.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RF-M and PL-R performed the experiments. TS and AR-M wrote the manuscript. AR-M designed the study.

FUNDING

This study was supported by Grants BFU2006-1455 (from the Ministerio de Economía y Competitividad) and a grant from the “Eugenio Rodríguez-Pascual Foundation” 2011 to AR-M.

REFERENCES

- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2012). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurochem.* 122, 891–899. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Sihra, T. S., and Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca^{2+} -calmodulin at thalamocortical synapses. *J. Neurochem.* 126, 565–578. doi: 10.1016/j.jneurochem.2013.01.071
- Bahn, S., Volk, B., and Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* 14, 5525–5547. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05525.1994
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signalling. *Neuron* 21, 13–26. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80510-3
- Bettler, B., Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O’Shea-Greenfield, A., Deneris, E. S., Moll, C., et al. (1990). Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5, 583–595. doi: 10.1016/0896-6273(90)90213-y
- Breustedt, J., and Schmitz, D. (2004). Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* 24, 10093–10098. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3078-04.2004
- Campbell, S. L., Mathew, S. S., and Hablitz, J. J. (2007). Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology* 53, 37–47. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.04.008
- Contractor, A., Sailer, A., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G., et al. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in KA2^{-/-} mice. *J. Neurosci.* 23, 422–429. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-02-00422.2003
- Cooper, D. M. (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem. J.* 375, 517–529. doi: 10.1042/bj20031061
- Delaney, A. J., and Jahr, C. E. (2002). Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* 36, 475–482. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01008-5
- Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., et al. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* 63, 818–829. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.010
- Fletcher, E. J., and Lodge, D. (1996). New developments in the molecular pharmacology of AMPA and kainate receptors. *Pharmacol. Ther.* 70, 65–89. doi: 10.1016/0163-7258(96)00014-9
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., and Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8, 775–785. doi: 10.1016/0896-6273(92)90098-x
- Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol.* 89, 183–195. doi: 10.2183/pjab.89.183
- Irving, A. J., Collingridge, G. L., and Schofield, J. G. (1992). Interactions between Ca^{2+} mobilising mechanisms in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 456, 667–680. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019360
- Jane, D. E., Lodge, D., and Collingridge, G. L. (2009). Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56, 90–113. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.023
- Ji, Z., and Stäubli, U. (2002). Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neurosci. Lett.* 331, 71–74. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00865-0
- Jouhanneau, J. S., Ball, S. M., Molnár, E., and Isaac, J. T. R. (2011). Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology* 60, 832–841. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.12.023
- Kamiya, H., and Ozawa, S. (1998). Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca^{2+} influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 509, 833–845. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.833bm.x
- Kamiya, H., and Ozawa, S. (2000). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *J. Physiol.* 523, 653–665. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00653.x
- Kamiya, H., Umeda, K., Ozawa, S., and Manabe, T. (2002). Presynaptic Ca^{2+} entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci.* 22, 10524–10528. doi: 10.1523/jneurosci.22-24-10524.2002
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., Isaac, J. T. R., et al. (2001a). A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32, 697–709. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00511-6
- Lauri, S. E., Delany, C., Clarke, V. E. J., Bortolotto, Z. A., Ornstein, P. I., Isaac, J. T., et al. (2001b). Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* 41, 907–915. doi: 10.1016/S0028-3908(01)00152-6
- Lauri, S. E., Bortolotto, Z. A., Nistico, R., Bleakman, D., Ornstein, P. L., Lodge, D., et al. (2003). A role for Ca^{2+} stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 39, 327–341. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00369-6
- Jerma, J., and Marques, J. M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80, 292–311. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.045

- Manabe, T., Willey, D. J., Perkel, D. J., and Nicoll, R. A. (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 70, 1451–1459. doi: 10.1152/jn.1993.70.4.1451
- Negrete-Díaz, J. V., Duque-Feria, P., Andrade-Talavera, Y., Carrión, M., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2012). Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* 121, 36–43. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07665.x
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., and Rodríguez-Moreno, A. (2006). Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* 96, 1829–1837. doi: 10.1152/jn.00280.2006
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Delgado-García, J. M., and Rodríguez-Moreno, A. (2007). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm. Vienna* 114, 1425–1431. doi: 10.1007/s00702-007-0750-4
- Perkinton, M. S., and Sihra, T. S. (1999). A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* 90, 1281–1292. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00573-9
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., and Wenthold, R. J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 349, 85–110. doi: 10.1002/cne.903490107
- Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J. R., et al. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1004, 12181–12186. doi: 10.1073/pnas.0608891104
- Reeve, J. E., Kohl, M. M., Rodríguez-Moreno, A., Paulsen, O., and Anderson, H. L. (2012). Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Commun. Integr. Biol.* 5, 240–242. doi: 10.4161/cib.19400
- Rodríguez-Moreno, A., Kohl, M. M., Reeve, J. E., Eaton, T. R., Collins, H. A., Anderson, H. L., et al. (2011). Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* 31, 8564–8569. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0274-11.2011
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2004). Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 557, 733–745. doi: 10.1113/jphysiol.2004.065029
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2007a). Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem.* 103, 2121–2135. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2007b). Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.* 30, 630–637. doi: 10.1016/j.tins.2007.10.001
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T. S. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Lett.* 587, 788–792. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.071
- Schmitz, D., Mellor, J., and Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291, 1972–1976. doi: 10.1126/science.1057105
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., and Rusakov, D. A. (2008). Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca^{2+} store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* 28, 13139–13149. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2932-08.2008
- Shira, T. S., and Rodríguez-Moreno, A. (2013). Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: mechanisms. *Neurochem. Int.* 62, 982–987. doi: 10.1016/j.neuint.2013.03.012
- Sihra, T. S., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2014). Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *Neuroscientist* 20, 29–43. doi: 10.1177/1073858413478196
- Smith, T. C., Wang, L. Y., and Howe, J. R. (1999). Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *J. Physiol.* 517, 51–58. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0051z.x
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., and Cull-Candy, S. G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* 492, 129–142. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021295
- Tong, G., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1996). Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16, 1147–1157. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80141-5
- Valbuena, S., and Lerma, J. (2016). Non-canonical signalling, the hidden life of ligand-gated ion channels. *Neuron* 92, 316–329. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.016
- Wang, H., and Storm, D. R. (2003). Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol. Pharmacol.* 63, 463–468. doi: 10.1124/mol.63.3.463
- Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., et al. (1999). Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23, 787–798. doi: 10.1016/s0896-6273(01)80036-2


Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Falcón-Moya, Losada-Ruiz, Sihra and Rodríguez-Moreno. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

Kainate Receptor-Mediated Depression of Glutamate Release Involves Protein Kinase A in the Cerebellum

Rafael Falcón-Moya, Pilar Losada-Ruiz and Antonio Rodríguez-Moreno * 

Laboratorio de Neurociencia Celular y Plasticidad, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Universidad Pablo de Olavide, ES-41013 Sevilla, Spain

* Correspondence: arodmor@upo.es; Tel.: +34-95497-7393

Received: 20 July 2019; Accepted: 23 August 2019; Published: 23 August 2019



Abstract: Kainate (KA) receptors (KAR) have important modulatory roles of synaptic transmission. In the cerebellum, the action mechanisms of KAR-mediated glutamatergic depression are unknown. We studied these mechanisms by recording evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) from cerebellar slices using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. We observed that 3 μ M KA decreased the amplitude of eEPSCs and increased the number of failures at the synapses established between parallel fibers (PF) and Purkinje neurons, and the effect was antagonized by NBQX under the condition where AMPA receptors were previously blocked. The inhibition of protein kinase A (PKA) suppressed the effect of KAR activation on eEPSC, and effect was not prevented by protein kinase C inhibitors. Furthermore, in the presence of Pertussis toxin, the depression of glutamate release mediated by KAR activation was prevented, invoking the participation of a $G_{i/o}$ protein in this modulation. Finally, the KAR-mediated depression of glutamate release was not prevented by blocking calcium-permeable KARs or by treatments that affect calcium release from intracellular stores. We conclude that KARs present at these synapses mediate an inhibition of glutamate release through a mechanism that involves the activation of G-protein and protein kinase A.

Keywords: kainate receptor; cerebellum; glutamate; protein kinase A; G-protein

1. Introduction

Kainate-type glutamate receptors are well-established mediators of canonical, ionotropic postsynaptic transmission and, presynaptically, these receptors support a modulatory regulation of neurotransmitter release. In the latter regard, kainate receptors (KARs) have a non-canonical metabotropic capacity, through which they effect the control of both glutamate and GABA release (for review see [1–9]). At several excitatory glutamatergic synapses, the KAR-mediated modulation is found to be biphasic, such that low agonist concentrations facilitate glutamate release, as opposed to higher agonist concentrations, which inhibit neurotransmitter release (see [2–5,9,10] for reviews). How this diametrically opposite modulation is mechanistically manifest is the subject of considerable debate and investigation, as is the question of the subcellular location of KARs responsible for presynaptic modulation [2–7].

KARs are expressed in the cerebellar cortex in the axons of cerebellar granule cells that form parallel fibers (PF) and form excitatory synapses with Purkinje cells (PuC) [11]. Messenger RNA transcripts encoding different KAR subunits (GluK1, GluK2 and GluK5) have been detected in granule cells, and functional expression of KAR subtypes has been reported ([12–15]. The subunits GluK1 and GluK2 have been detected on parallel fibers [15]. Biophysical studies with single-channel recordings have shown GluK1 activity [16], suggesting these KARs are Ca^{2+} -permeable. A biphasic action of KARs, activated by the agonist domoate, has been shown previously at the PF-PuC synapse, with low agonist concentrations facilitating synaptic transmission and higher concentrations depressing synaptic

transmission [17]. Recently we determined the mechanism by which the activation of KAR mediated the facilitation of glutamate release found at these synapses involving a calcium-calmodulin-adenylate cyclase (AC)-protein kinase A (PKA) involvement pathway [18]. Here, we have determined the mechanism underpinning the depressant effect of KA in cerebellar slices at synapses between granule cell terminals and PuC.

We found that the KAR-mediated depression of glutamate release has an obligatory dependency on G protein function and cAMP-mediated PKA activity at PF-PuC synapses in the cerebellum.

2. Results

2.1. The Activation of Kainate Receptors by 3 μ M KA Produces A Decrease in the Amplitude of NMDA Receptor-Mediated Postsynaptic Currents at PF-PuC Synapses

Following the observation that glutamatergic transmission at PF-PuC synapses of juvenile rat pups is modulated by KARs in a biphasic manner [17], as is also the case in the hippocampus [2–5], we established the parallel fiber-Purkinje (PF-PuC) synapse paradigm in slices from early adult mouse cerebellum to study the mechanisms involved in glutamate release modulation mediated by KAR-activation. The experimental paradigm we used was the stimulation of parallel fiber axons while measuring NMDA receptor-mediated eEPSCs in PuCs, by obtaining whole-cell patch clamp recordings, with the membrane potential held at +40 mV. Recordings were made in the presence of 30 μ M GYKI53655, in order to obviate AMPA receptor activation, as well as the presence of 10 μ M bicuculline, to antagonize GABA_A receptors (in the presence of GYKI53655, AMPA currents were completely blocked from 80 ± 7 pA in control to 3 ± 2 pA in the presence of 30 μ M GYKI53655, $n = 6$). In the presence of bicuculline, GABA_A currents were completely blocked (from 130 ± 12 pA in control to 4 ± 3 pA in the presence of 10 μ M bicuculline, $n = 6$). In the presence of GYKI53655 and bicuculline, the addition of 50 μ M D-AP5 completely blocked the remaining current indicating that was an NMDA current (from 60 ± 8 pA in control to 4 ± 3 pA in the presence of 50 μ M D-AP5, $n = 6$). In our experiments, young adult cerebellar synapses showed detectable depression (after a transient increase) of NMDA receptor-mediated eEPSC amplitudes when 3 μ M KA was applied ($61 \pm 7\%$, $n = 8$, Figure 1A,B), with 0.3 and 1 μ M agonist concentrations having smaller effects ($75 \pm 6\%$, $n = 6$, $73 \pm 9\%$, $n = 6$, respectively; transient increases in eEPSC amplitudes to: $117 \pm 5\%$, $n = 6$ for KA 0.3 μ M; $122 \pm 6\%$, $n = 6$ for KA 1 μ M and $138 \pm 13\%$, $n = 8$, for KA 3 μ M). To analyze the mechanistic details of the KAR-mediated depression of glutamatergic transmission, we hereafter utilized 3 μ M KA in subsequent electrophysiological experiments as 3 μ M KA produced the maximum level of depression observable. To determine whether the effect of KA recorded from Purkinje neurons in slices was mediated by the activation of KARs, analogous to that observed in other brain regions, such as the hippocampus and cortex [18–34], we performed experiments in the presence of NBQX. We showed that the 3 μ M KA biphasic effect on the eEPSC amplitude was abolished in the presence of 10 μ M NBQX ($95 \pm 3\%$, $n = 6$, Figure 1A). In these experiments, because AMPA receptors were previously antagonized in the presence of the selective blocker GYKI53655 in the bath, the observation of full antagonism by NBQX invoked the modulation to be due to KARs specifically. Further, in line with the notion that the depression (and the facilitation) of synaptic transmission observed was exclusively contingent on KAR activation.

In our studies, we confirmed a presynaptic locus of action by using several approaches. First, we performed paired-pulse recordings and measured the paired-pulse ratio (PPR; pair-pulse facilitation was observed at 40 ms pulse interval). PPR was 1.9 ± 0.4 ($n = 8$) under control/baseline conditions. After KA treatment, PPR increased to 2.2 ± 0.2 ($n = 8$), implying an effect on release probability [35], thereby corroborating the presynaptic origin of the KA receptor-mediated regulation. Second, we determined the proportion of synaptic failures in the presence of KA. Under control conditions, the synaptic failure rate was $19 \pm 4\%$, $n = 5$. Following the application of KA, the failure rate was measurably increased (to $37 \pm 8\%$, $n = 6$), again indicating a presynaptic locus of KA action. Finally, we compared the KA-mediated modulation of NMDA receptor-mediated eEPSCs (with GYKI53655 present) and

AMPA receptor-mediated eEPSCs recorded at -70 mV (without GYKI53655, but with D-AP5 and bicuculline, to respectively block NMDA and GABA_A receptors). KA mediated a comparable decreased in the NMDA receptor-mediated eEPSCs ($67 \pm 5\%$, $n = 6$) and the AMPA receptor-mediated eEPSCs ($71 \pm 2\%$, $n = 5$, Figure 1C). This congruent depression of NMDA and AMPA receptor-mediated eEPSC amplitudes intimates that KA-modulation occurs presynaptically, through decreased glutamate release. Together, the preceding evaluation reliably shows a presynaptic locus of action of KA at the PF-PuC synapses under investigation.

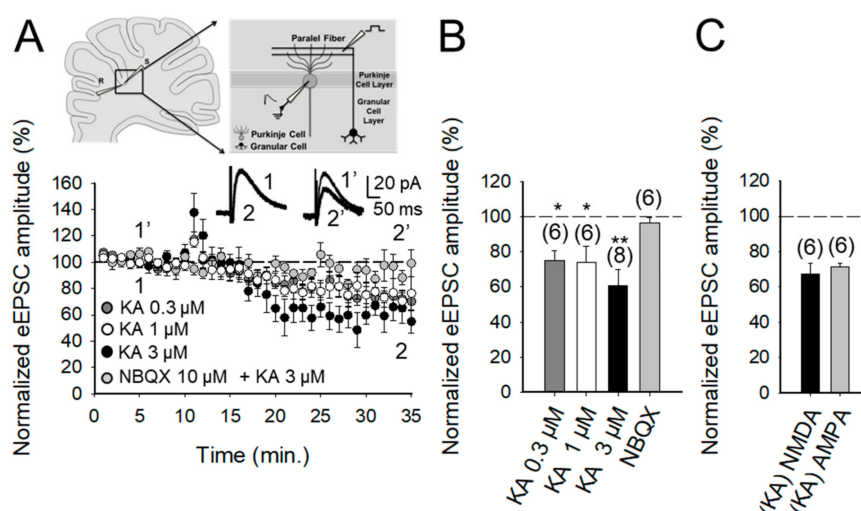


Figure 1. Kainate (KA) reduces the evoked excitatory postsynaptic current (eEPSC) amplitude at parallel fibers-Purkinje cell (PF-PuC) synapses of the cerebellum. (A) The picture shows the experimental setup. The graph shows the time course of the KA (0.3, 1 and 3 μ M) effect on eEPSC amplitude in the absence (dark grey, white and black symbols) and presence of NBQX for KA 3 μ M (grey). The inset shows traces before and after KA 3 μ M treatment in the absence (1, 2) and in the presence of 10 μ M NBQX (1', 2'). (B) Quantification of modulation and dose dependency of the KA effect on eEPSC amplitude in the absence and presence of NBQX. (C) Effect of KA (3 μ M) on NMDA and AMPA receptor-mediated currents. Note that the effect of KA on these currents is indistinguishable. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as the means \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's t -test).

2.2. KAR-Mediated Depression of Glutamatergic Transmission at PF-PuC Is Contingent on cAMP-Dependent Signaling

With the selectivity of the action of KA and the locus of action verified, in subsequent experiments we examined the second messenger system that mediates the depression of eEPSCs. First, we tested whether PKA was involved in the decreased eEPSCs, by inhibiting either the modulatory or catalytic activity of the kinase, by using the cAMP-Rp or H-89. With the addition of 2 μ M H-89 or 100 μ M cAMP-Rp, the depression of the eEPSC amplitude by 3 μ M KA was prevented ($93 \pm 5\%$, $n = 7$ after H-89 and $91 \pm 8\%$, $n = 7$ after cAMP-Rp, vs. KA 3 μ M, $60 \pm 7\%$, after a transient increase of eEPSCs to $126 \pm 5\%$ of baseline amplitude, $n = 14$ Figure 2A,B). The data together point to PKA playing an obligatory part in the observed KAR-mediated modulation of PF-PuC cerebellar glutamatergic transmission. However, given that in other slice preparations, protein kinase C (PKC) has also been implicated in aspects of the KAR-mediated modulation [2,3,9], we examined whether this kinase plays a role in the modulation of the PF-PuC cerebellar synapse by KA. In slice experiments using calphostin C (1 μ M) to specifically inhibit PKC, no prevention of KAR-mediated depression was found ($64 \pm 9\%$, $n = 6$, Figure 2B), therefore obviating an involvement of PKC in the modulation observed.

The mechanisms mediating KAR-mediated facilitation of glutamate release involve calcium-calmodulin activation of AC [18]. We wanted to check if for the observed depression

of the transmission the same mechanism operates. We examined this at the cerebellar PF-PuC synapse by treating slices with the calmodulin antagonist, W-7, before recording eEPSCs. With W-7 (25 μ M) present, KA (3 μ M)-mediated depression was not affected ($75 \pm 7\%$, $n = 6$, with W-7 vs. $60 \pm 7\%$, $n = 8$ without W7, in interleaved slices; Figure 2B). We additionally performed experiments in the presence of calmidazolium (CMZ, 1 μ M), an alternative calmodulin antagonist. As with W-7, in presence of CMZ, KA (3 μ M)-mediated depression of synaptic transmission was not abrogated (52 ± 10 , $n = 6$, Figure 2B). These data show that a presynaptic Ca^{2+} -calmodulin complex is not necessary for KAR-mediated depression of glutamate release at PF-PuC synapses.

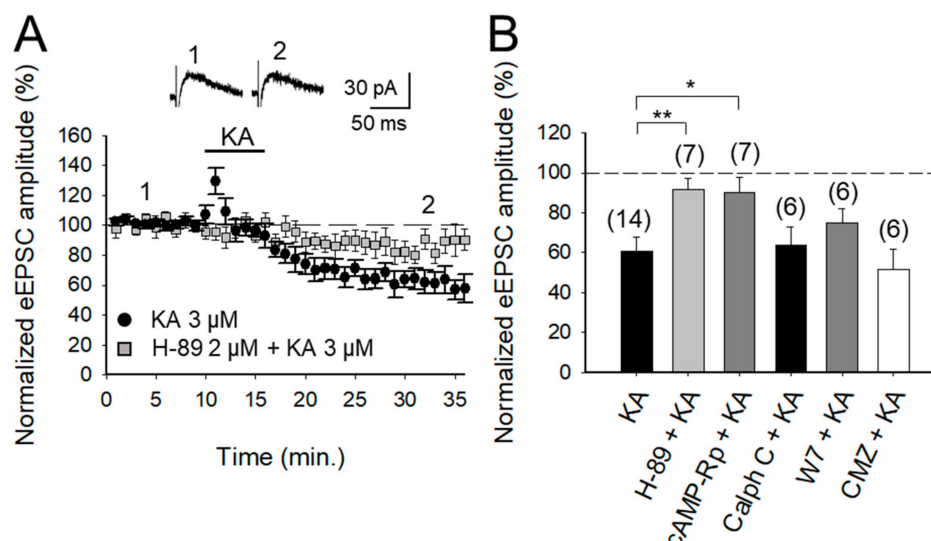


Figure 2. Adenylyl cyclase (AC) and downstream protein kinase A (PKA) under the KA-mediated depression of glutamate release in PF-PuC synapses. (A) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control and H-89 treated slices. Inset shows representative traces showing that KA (3 μ M) does not decrease the amplitude of the eEPSCs in H-89 treated slices. (B) Summary of results. Blockade of PKA by H-89 (2 μ M) or cAMP-Rp (100 μ M) prevented the depressive action of KA. Blockade of protein kinase C (PKC) with calphostin C (1 μ M) had no effect on the KAR-mediated decrease of the eEPSC amplitude (when compared to the first bar, KA). Depression similar to non-treated slices was observed on eEPSC amplitude in slices treated with 25 μ M W-7 or 1 μ M CMZ. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, ANOVA test).

2.3. KAR-Mediated Depression of Glutamate Release Requires G Protein at PF-PuC Synapses

$G_{i/o}$ proteins have been reported to be involved in KAR signaling previously since the discovery of a role in KAR-mediated modulation of GABA release in the hippocampus (see [9] for review). Additionally, a role of G protein in KAR-mediated modulation of glutamate release has also been described in the hippocampus [36] and in the amygdala [37]. To determine whether a similar mechanism operates in the cerebellum to modulate glutamate release, we examined here the effect of KA on slices treated with Pertussis toxin (PTx, 5 μ g/mL). We found that the inhibitory effect of KA was indeed suppressed by PTx, implying selective G-protein involvement in inhibitory modulation by KAR in the preparation under study ($102 \pm 6\%$, $n = 6$; vs. control $62 \pm 9\%$, after a transient increase of eEPSC to $131 \pm 9\%$ of baseline amplitude, $n = 6$, Figure 3A,B).

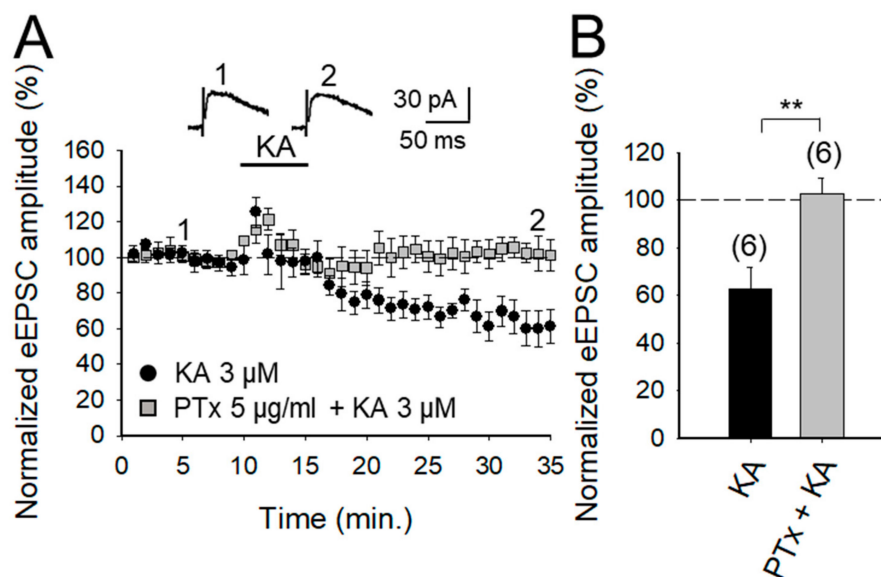


Figure 3. KAR-mediated depression of glutamate release is prevented in slices treated with pertussis toxin. (A) Time-course of the effect of KA on eEPSC amplitude in control slices and in slices treated with pertussis toxin. Inset shows representative traces showing that KA (3 μ M) does not affect the amplitude of the eEPSCs in pertussis toxin-treated slices. (B) Summary of results. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means \pm SEM (** $p < 0.01$, Student's t -test).

2.4. The Depression of Glutamate Release at PF-PuC Synapses is not Mediated by Calcium-Permeable KAR and does not Require Calcium Release from Intracellular Stores

The role of Ca^{2+} in mediating KAR-mediated synaptic transmission has been subject of debate and controversy, for instance, at the hippocampal mossy fiber-CA3 (MF-CA3) synapses. Some studies suggest that permeation of Ca^{2+} through KARs and subsequent Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from intracellular stores is obligatory for short-term and long-term plasticity at MF-CA3 synapses [21,30,38]. Others have registered no effect of KA on cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ [39] and yet others advocate that a decrease in Ca^{2+} concentration underpins the modulation due to KAR activation [40,41]. To examine the requirement of Ca^{2+} at these cerebellar synapses to depress glutamate release, we investigated first the effect of ryanodine, which selectively inhibits Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release [42], to elucidate whether this underpins KAR-mediated depression. Ryanodine (10 μ M) treatment had no effect on the KAR-mediated depression of transmission at these PF-PuC synapses ($69 \pm 9\%$, $n = 7$, with ryanodine vs. $62 \pm 7\%$, $n = 6$, without ryanodine, in interleaved slices after a transient increase of eEPSCs to $124 \pm 9\%$ of baseline amplitude; Figure 4A,B). Second, to establish whether the activation of KAR causes a Ca^{2+} signal that requires amplification by mobilization of intracellular Ca^{2+} storage, we examined the effect of KA after depletion of intracellular Ca^{2+} stores, using thapsigargin to inhibit the accumulation of Ca^{2+} in the SERCA pump. Treatment with thapsigargin (2 μ M) did not affect KAR-mediated depression ($68 \pm 9\%$, $n = 6$, with thapsigargin vs. $62 \pm 7\%$, $n = 6$, without thapsigargin, in slices interspersed, Figure 4B). Finally, to corroborate the previous results and rule out that the presence of permeating Ca^{2+} KAR plays some role in the KA-dependent mechanism in these cerebellar synapses, we investigated the effect of KA on the eEPSC amplitudes in the presence of philanthotoxin, a toxin shown to block unedited, Ca^{2+} permeable KARs [30,43]. After treatment of slices with 3 μ M philanthotoxin, the synaptic depression mediated by 3 μ M KA was not prevented (to $56 \pm 11\%$ of initial amplitude, $n = 7$ vs. $62 \pm 7\%$, $n = 6$ observed in interleaved slices, Figure 3B). All of these compounds were acting at the concentrations used, and while they did not block depression, they blocked the transient increase in eEPSCs observed in control slices: $84 \pm 6\%$, $n = 6$ in ryanodine, $76 \pm 6\%$, $n = 7$ in thapsigargin, and $77 \pm 6\%$, $n = 7$ in philanthotoxin vs. $62 \pm 7\%$, $n = 6$ transient increase observed in control interleaved

slices). Together, these results show that Ca^{2+} permeation through KAR and Ca^{2+} mobilization from internal stores has no role in the synaptic depression observed at PF-PuC synapses.

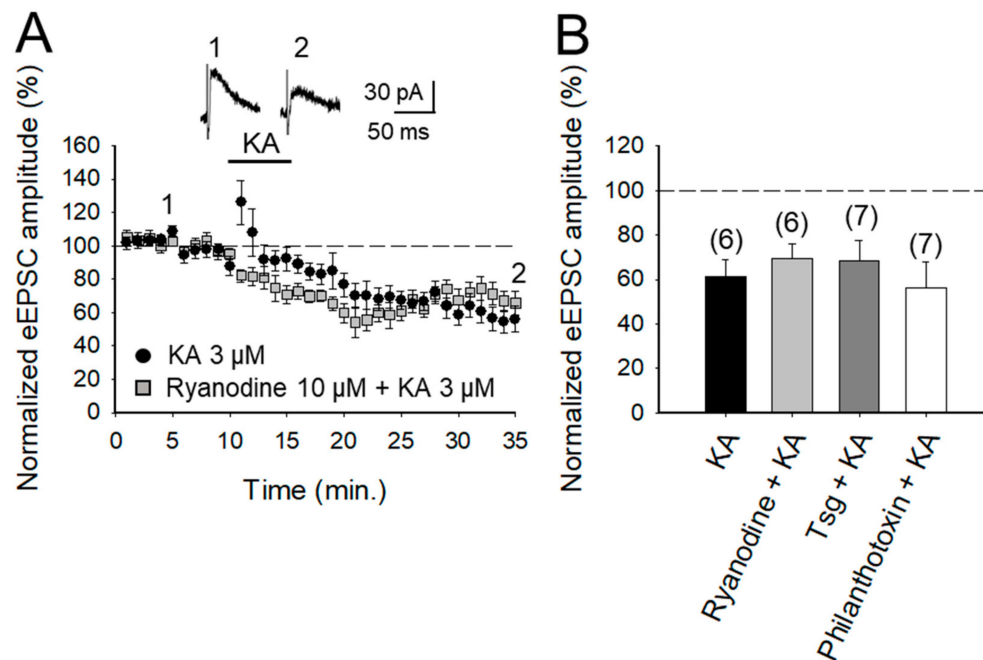


Figure 4. KAR-mediated depression of glutamate release does not require changes in Ca^{2+} in the cytosol at the PF-PuC synapses. **(A)** Time-course of KA (3 μM) effect on eEPSC amplitude under the control condition (circles) and in slices treated with Ryanodine (squares). **(B)** Quantification of results for slices treated with ryanodine, thapsigargin and Philanthotoxin. The decrease of eEPSC amplitudes induced by KA is not prevented in any case. The number of slices (from two to three mice) is indicated in parentheses at the top of each bar. Results are expressed as means \pm SEM (Student's *t*-test and ANOVA).

3. Discussion

Presynaptic KARs are well known to have a biphasic effect on the release of neurotransmitters, so that low doses of agonists produce an increase in the release of neurotransmitters, while higher concentrations produce a decrease in eEPSCs [2–9]. Although the role of the PKC pathway in some KAR actions is well recognized [2–9], some authors have found that KAR activities are not adequately ionotropic and are not mediated by protein kinases [44] or are mediated by PKA in the hippocampus [26,36,45,46] and in the amygdala [37]. Here, we show that this mechanism involving PKA is not restricted to the hippocampus and the amygdala and extend it to the cerebellum.

The results in this study, utilizing electrophysiological experiments in cerebellar slices, show that the activation of presynaptic KARs, at PF-PuC synapses, invokes a depression of synaptic transmission/glutamate release. Analysis of this modulation suggests a mechanistic coupling of KARs to PKA activity, by the activation of a G-protein. The observed KA-mediated decrease of the eEPSCs at PF-PuC synapses is due to decreased glutamate release, which could be monitored by NMDA receptor-mediated currents (with AMPA receptors antagonized by GYKI53655), and blocked by the KAR/AMPA receptor antagonist NBQX. Under conditions where the AMPA receptor activation is obviated by GYKI53655, this therefore delineates the specific role of KARs in the depressive regulation.

In assessing synaptic regulation, it is of utmost importance to identify the subcellular location of the KAR postulated. We corroborated the presynaptic presence of KARs by electrophysiological analysis of a presynaptically manifest parameter, i.e., the PPR (pair-pulse ratio) of consecutive eEPSCs mediated by neurotransmitter release. A clear increase in the PPR of eEPSCs observed with KA application

in our experiments suggested a change in release probability (by definition a presynaptic property in synaptic transmission). Secondly, we assessed the proportion of synaptic failures in response to KA application. With KA application, the failure proportion was evidently increased, supportive of a decrease in the probability of presynaptic transmitter release and corroborative of the observed depression occurring through KAR activation. Finally, and importantly, the effects of KA observed on NMDA and AMPA receptor-mediated currents were similar. Given that no such equivalence would be predicted if the observed modulation was postsynaptic, the data here are supportive of a presynaptic mode of action for KARs being activated. Altogether, three independent analyses mutually corroborate and emphasize a presynaptic locus of action of KARs functioning at PF-PuC synapses. It remains to be elucidated whether the presynaptic regulation by KA at PF-PuCs reports the activity of KARs subcellularly localized at the nerve terminal/axonal or somatodendritic compartments. The technically challenging paradigms needed to address this question are beyond the scope of the present paper. However, to directly elucidate the presynaptic compartmentalization of KARs, future work necessitates: (i) high-resolution immunolocalization (immunogold-based) of the receptor (contingent on the availability of high affinity antibodies with appropriate KAR subunit-specificity); (ii) targeted blockade of KARs using caged-antagonists (contingent on the pending development of reagents) and (iii) paired recordings (see NMDA receptor studies), [47–51].

In agreement with our previous studies on the hippocampus and the amygdala [36,37] the inhibition of PKA by the cyclic nucleotide analog cAMP-Rp results in the cancellation of the depression mediated by KA of synaptic transmission/release of glutamate in the PF-PuC synapses. The congruence of the mechanism between the synapses is also highlighted in the current study, by observing the inhibition of the catalytic activity of PKA by H-89 [18,26,27,33,34].

In contrast to the mechanism mediating the increase in glutamate release, for depression, preventing the correct functioning of G protein by PTx treatment impedes KAR-mediated depression of glutamate release, showing that there is an initiation / transduction mediated by the G protein followed by cAMP signaling for the subsequent activation of PKA. In the canonical context, the KAR can mediate the entry of external Ca^{2+} through ionotropic activity [30,43,52], or Ca^{2+} can be released from intracellular stores, but in our results, a blockade of KAR permeable to Ca^{2+} by the selective inhibitor, philanthotoxin, or the treatment of the slices with ryanodine, or thapsigargin did not cancel the synaptic depression mediated by KA, ruling out the entry of Ca^{2+} through KARs or the release of calcium from intracellular stores as the participants in the signaling process that mediate the observed depression of glutamate release mediated by KAR-activation. From our results, it is also clear that the KAR function is conserved at the PF-PuC synapses and is not limited to the first two postnatal weeks as previously reported [17]. KARs have a self-receptor role in developing animals, with the concentration of agonist that determines the presynaptic modulation: facilitation (at low [KA]) and depression (at high [KA]) and, therefore, supposedly determining the consolidation and stability of synapses. However, the modulation of the presynaptic function reported in this document may manifest some forms of plasticity as synaptic refinement may involve glutamate receptors and plasticity [53,54] and KARs have been shown to be involved in plasticity at the PF-PuC synapses (for a review, see [55–57]. Additionally, KARs have been involved in some brain alterations such as epilepsy [58] but whether this involves the cerebellum has not been determined yet. A direct relationship exists between KA injection and cerebellar ataxia. Thus, the cerebellum is an important target to study functions of KARs and their possible role causing ataxia [59–62]. Furthermore, in patients with schizophrenia, an increase in KARs containing GluK2 and GluK5 subunits is observed [63,64]. In neurodegeneration, it has been found that local application of KA in some areas of the cerebellum produces changes in different ion levels, highly increasing Ca^{2+} levels for weeks, which mediate calcification [65]. KARs have been described as producing increases in intracellular calcium [18,66] and KARs seems to signal increasing intracellular calcium without putting the cell at risk due to excitotoxicity, due to its low conductance in contrast to AMPARs. Due to the lack of knowledge on the subject, further exploration is necessary to determine the KAR role in cerebellum development and cerebellar alterations.

In conclusion, our study shows that the presynaptic activation of KAR by KA at the PF-PuC synapses produces a depression of synaptic transmission and a decrease in the amount of glutamate released. We postulate that mechanically, KAR-mediated presynaptic depression involves the activation of a G protein that would signal the activation of AC1 or AC8 to reduce cAMP levels to mediate a decrease in glutamate release and, therefore, in synaptic transmission at the PF-PuC synapses in the cerebellum.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

The experiments were performed on 4–6-week-old C57Bl/6 male mice obtained from Harlan Laboratories (Spain). Experiments were conducted in accordance with the European Union directive for the use of laboratory animals in acute experiments and were approved by the local Ethical Committee (Junta de Andalucía and University Pablo de Olavide, Sevilla, Spain) (Session 2/12, 8 February 2012).

4.2. Slice Preparation

Cerebellar parasagittal acute slices were prepared as described previously [18] (Falcón-Moya et al., 2018). Briefly, after decapitation, the whole brain was removed under ice-cold buffered salt solution consisting of (in mM) 124 NaCl, 2.69 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose (pH 7.2, 300 mOsm) and was positioned on the stage of a vibratome slicer (Leica 1000S) and cut to obtain cerebellar slices (350 µm thick) containing parallel fibers-Purkinje cells synapses. Slices were maintained continuously oxygenated for at least 1 h before use. All experiments were carried out at room temperature (22–25 °C). In total, 6–14 slices from 2–3 animals were used for each experiment.

4.3. Electrophysiological Recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from Purkinje neurons. NMDA receptor-mediated evoked postsynaptic currents (eEPSCs) were recorded at +40 mV from these neurons visually identified by infrared-differential interference contrast (IR-DIC) microscopy using a 40× water immersion objective. Perfusion solution contained GYKI53655 (30 µM), to block AMPA receptors, and bicuculline (10 µM), to block GABA_A receptors. In experiments involving AMPA receptor-mediated currents, performed at −70 mV, no GYKI53655 was used, but D-AP5 (50 µM) was included to block NMDA receptors. To evoke eEPSCs, electrical pulses were delivered to granule cells axons (parallel fibers) using a monopolar electrode placed in the molecular layer at a frequency of 0.2 Hz. Patch electrodes were made from borosilicate glass and had a resistance of 4–7 MΩ when filled with (mM): 120 CsCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 0.2 CaCl₂, 10 HEPES, 2 EGTA and 20 QX-314 (pH 7.2, 290 mOsm). A 40 ms paired-pulse stimulation protocol was used for pair pulse ratio (PPR) analysis. Neurons were voltage clamped, using a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA, USA). Access resistance was regularly monitored during recordings, and cells were rejected if it changed >15% during the experiment. Data were filtered at 2 kHz, digitized at 10 kHz, and stored on a computer using pClamp software (Molecular Devices). Synaptic failures were identified as the lack of synaptic responses after presynaptic stimulation with the amplitude of these responses being no different from basal noise amplitude.

4.4. Data Analysis

Data were normalized, taking the control as 100% of the response, and are presented as means ± SEM. Signals were averaged every 12 traces. Effects of KA were measured at peak (maximum) compared to averaged 10 min baseline points. Significance was assessed at $p < 0.05$. A normality and equal variance test was performed before statistical comparisons. Statistical comparisons were made using two-tailed Student's *t*-test for comparison of two data sets and analysis of variance (ANOVA) for comparison of multiple data sets using the Bonferroni as a *post hoc* test.

4.5. Compounds

Salts and general reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); GYKI 53655, D-AP5, NBQX, bicuculline, Rp-Br-cAMP, H-89, forskolin, philanthotoxin, ryanodine, thapsigargin, kainate, Pertussis toxin, CMZ and W-7 were obtained from Tocris (Bristol, UK).

Author Contributions: Conceptualization, A.R.-M.; methodology, A.R.-M.; formal analysis, R.F.-M. and P.L.-R.; investigation, A.R.-M., R.F.-M. and P.L.-R.; resources, A.R.-M.; data curation, R.F.-M. and P.L.-R.; writing—original draft preparation, A.R.-M.; writing—review and editing, A.R.-M.; visualization, A.R.-M.; supervision, A.R.-M.; project administration, A.R.-M. and R.F.-M.; funding acquisition, A.R.-M.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, grant number BFU2012-38208-P.

Acknowledgments: We thank Dr. Cristina Calvino for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lerma, J.; Paternain, A.V.; Rodríguez-Moreno, A.; López-García, J.C. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.* **2001**, *89*, 971–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 2121–2135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 630–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jane, D.E.; Lodge, D.; Collingridge, G.L. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutical potential. *Neuropharmacology* **2009**, *56*, 90–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *717*, 39–48.
6. Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *717*, 1–10.
7. Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: Mechanisms. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 982–987. [[CrossRef](#)]
8. Valbuena, S.; Lerma, J. Non-canonical signalling, the hidden life of ligand-gated ion channels. *Neuron* **2016**, *92*, 316–329. [[CrossRef](#)]
9. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *20*, 128. [[CrossRef](#)]
10. Lerma, J.; Marques, J.M. Kainate receptors in health and disease. *Neuron* **2013**, *80*, 292–311. [[CrossRef](#)]
11. Smith, T.C.; Wang, L.Y.; Howe, J.R. Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *J. Physiol.* **1999**, *517*, 51–58. [[CrossRef](#)]
12. Bettler, B.; Boulter, J.; Hermans-Borgmeyer, I.; O’Shea-Greenfield, A.; Deneris, E.S.; Moll, C. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron* **1990**, *5*, 583–595. [[CrossRef](#)]
13. Herb, A.; Burnashev, N.; Werner, P.; Sakmann, B.; Wisden, W.; Seeburg, P.H. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* **1992**, *8*, 775–785. [[CrossRef](#)]
14. Bahn, S.; Volk, B.; Wisden, W. Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 5525–5547. [[CrossRef](#)]
15. Petralia, R.S.; Wang, Y.X.; Wenthold, R.J. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* **1994**, *349*, 85–110. [[CrossRef](#)]
16. Swanson, G.T.; Feldmeyer, D.; Kaneda, M.; Cull-Candy, S.G. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol.* **1996**, *492*, 129–142. [[CrossRef](#)]
17. Delaney, A.J.; Jahr, C.E. Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* **2003**, *36*, 475–482. [[CrossRef](#)]

18. Falcón-Moya, R.; Losada-Ruiz, P.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Cerebellar kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release requires Ca^{2+} -calmodulin and PKA. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 195. [\[CrossRef\]](#)
19. Lauri, S.E.; Bortolotto, Z.A.; Bleakman, D.; Ornstein, P.L.; Lodge, D.; Isaac, J.T.R. A critical role of a facilitatory kainate autoreceptor in mossy fiber LTP. *Neuron* **2001**, *32*, 697–709. [\[CrossRef\]](#)
20. Lauri, S.E.; Delany, C.; Clarke, V.E.J.; Bortolotto, Z.A.; Ornstein, P.I.; Isaac, J.T. Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* **2001**, *41*, 907–915. [\[CrossRef\]](#)
21. Lauri, S.E.; Bortolotto, Z.A.; Nistico, R.; Bleakman, D.; Ornstein, P.L.; Lodge, D. A role for Ca^{2+} stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* **2003**, *39*, 327–341. [\[CrossRef\]](#)
22. Schmitz, D.; Mellor, J.; Nicoll, R.A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* **2001**, *291*, 1972–1976. [\[CrossRef\]](#)
23. Ji, Z.; Stäubli, U. Presynaptic kainate receptors play different physiological roles in mossy fiber and associational-commissural synapses in CA3 of hippocampus from adult rats. *Neurosci. Lett.* **2002**, *331*, 71–74. [\[CrossRef\]](#)
24. Contractor, A.; Sailer, A.; Darstein, M.; Maron, C.; Xu, J.; Swanson, G. Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation at mossy-fiber synapses in $\text{KA2}^{-/-}$ mice. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 422–429. [\[CrossRef\]](#)
25. Breustedt, J.; Schmitz, D. Assessing the role of GLUK5 and GLUK6 at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10093–10098. [\[CrossRef\]](#)
26. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J. Physiol.* **2004**, *557*, 733–745. [\[CrossRef\]](#)
27. Rodríguez-Moreno, A.; Sihra, T.S. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 788–792. [\[CrossRef\]](#)
28. Campbell, S.L.; Mathew, S.S.; Hablitz, J.J. Pre- and postsynaptic effects of kainate on layer II/III pyramidal cells in rat neocortex. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 37–47. [\[CrossRef\]](#)
29. Pinheiro, P.S.; Perrais, D.; Coussen, F.; Barhanin, J.; Bettler, B.; Mann, J.R. GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12181–12186. [\[CrossRef\]](#)
30. Scott, R.; Lalic, T.; Kullmann, D.M.; Capogna, M.; Rusakov, D.A. Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca^{2+} store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 13139–13149. [\[CrossRef\]](#)
31. Fernandes, H.B.; Catches, J.S.; Petralia, R.S.; Copits, B.A.; Xu, J.; Russell, T.A. High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron* **2009**, *63*, 818–829. [\[CrossRef\]](#)
32. Jouhanneau, J.S.; Ball, S.M.; Molnár, E.; Isaac, J.T.R. Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 832–841. [\[CrossRef\]](#)
33. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 891–899. [\[CrossRef\]](#)
34. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic kainate-receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca^{2+} -calmodulin at thalamocortical synapses. *J. Neurochem.* **2013**, *126*, 565–578. [\[CrossRef\]](#)
35. Manabe, T.; Willey, D.J.; Perkel, D.J.; Nicoll, R.A. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **1993**, *70*, 1451–1459. [\[CrossRef\]](#)
36. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Delgado-García, J.M.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* **2006**, *96*, 1829–1837. [\[CrossRef\]](#)
37. Negrete-Díaz, J.V.; Duque-Feria, P.; Andrade-Talavera, Y.; Carrión, M.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *J. Neurochem.* **2012**, *121*, 36–43. [\[CrossRef\]](#)

38. Lyon, L.; Borel, M.; Carrión, M.; Kew, J.N.; Corti, C.; Harrison, P.J.; Burnet, P.W.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse* **2011**, *65*, 945–954. [\[CrossRef\]](#)
39. Kamiya, H.; Umeda, K.; Ozawa, S.; Manabe, T. Presynaptic Ca²⁺ entry is unchanged during hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 10524–10528. [\[CrossRef\]](#)
40. Kamiya, H.; Ozawa, S. Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.* **1998**, *509*, 833–845. [\[CrossRef\]](#)
41. Kamiya, H.; Ozawa, S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre. *J. Physiol.* **2000**, *523*, 653–665. [\[CrossRef\]](#)
42. Berridge, M.J. Neuronal calcium signalling. *Neuron* **1998**, *21*, 13–26. [\[CrossRef\]](#)
43. Fletcher, E.J.; Lodge, D. New developments in the molecular pharmacology of AMPA and kainate receptors. *Pharmacol. Ther.* **1996**, *70*, 65–89. [\[CrossRef\]](#)
44. Frerking, M.; Schmitz, D.; Zhou, Q.; Johansen, J.; Nicoll, R.A. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3 CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 2958–2966. [\[CrossRef\]](#)
45. Negrete-Díaz, J.V.; Sihra, T.S.; Delgado-García, J.M.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *J. Neural Transm.* **2007**, *114*, 1425–1431. [\[CrossRef\]](#)
46. Grabauskas, G.; Lancaster, B.; O'Connor, V.; Wheal, H.V. Protein kinase signalling requirements for metabotropic action of kainate receptors in rat CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* **2007**, *579*, 363–373. [\[CrossRef\]](#)
47. Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 744–745. [\[CrossRef\]](#)
48. Rodríguez-Moreno, A.; Kohl, M.M.; Reeve, J.E.; Eaton, T.R.; Collins, H.A.; Anderson, H.L.; Paulsen, O. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8564–8569. [\[CrossRef\]](#)
49. Reeve, J.E.; Kohl, M.M.; Rodríguez-Moreno, A.; Paulsen, O.; Anderson, H.L. Caged intracellular NMDA receptor blockers for the study of subcellular ion channel function. *Commun. Integr. Biol.* **2012**, *5*, 240–242. [\[CrossRef\]](#)
50. Rodríguez-Moreno, A.; González-Rueda, A.; Banerjee, A.; Upton, A.L.; Craig, M.T.; Paulsen, O. Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron* **2013**, *77*, 35–42. [\[CrossRef\]](#)
51. Pérez-Rodríguez, M.; Arroyo-García, L.E.; Prius-Mengual, J.; Andrade-Talavera, Y.; Armengol, J.A.; Pérez-Villegas, E.M.; Duque-Feria, P.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Adenosine receptor-mediated developmental loss of spike timing-dependent depression in the hippocampus. *Cereb. Cortex.* **2018**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
52. Perikinton, M.S.; Sihra, T.S. A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* **1999**, *90*, 1281–1292. [\[CrossRef\]](#)
53. Torres-García, M.E.; Solís, O.; Patricio, A.; Rodríguez-Moreno, A.; Camacho-Abrego, I.; Limón, I.D.; Flores, G. Dendritic morphology changes in neurons from the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens in rats after lesion of the thalamic reticular nucleus. *Neuroscience* **2012**, *223*, 429–438. [\[CrossRef\]](#)
54. Andrade-Talavera, Y.; Duque-Feria, P.; Paulsen, O.; Rodríguez-Moreno, A. Presynaptic spike timing-dependent long-term depression in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex.* **2016**, *26*, 3637–3654. [\[CrossRef\]](#)
55. Hirano, T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol.* **1992**, *89*, 183–195. [\[CrossRef\]](#)
56. Sihra, T.S.; Flores, G.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptors: multiple roles in neuronal plasticity. *Neuroscientist* **2014**, *20*, 29–43. [\[CrossRef\]](#)
57. Mateos-Aparicio, P.; Rodríguez-Moreno, A. The impact of studying brain plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 66. [\[CrossRef\]](#)
58. Falcón-Moya, R.; Sihra, T.S.; Rodríguez-Moreno, A. Kainate receptors: Role in epilepsy. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 217. [\[CrossRef\]](#)
59. Maiti, A.; Salles, K.S.; Grassi, S.; Abood, L.G. Behavior and receptor changes after kainate lesioning of nodular cerebellum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1986**, *25*, 589–594. [\[CrossRef\]](#)

60. De Vera, N.; Camón, L.; Martínez, E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, *12*, 397–405. [[CrossRef](#)]
61. Yamaguchi, T.; Hayashi, K.; Murakami, H.; Maruyama, S.; Yamaguchi, M. Distribution and characterization of the glutamate receptors in the CNS of ataxic mutant mouse. *Neurochem. Res.* **1984**, *9*, 497–505. [[CrossRef](#)]
62. Andoh, T.; Kishi, H.; Motoki, K.; Nakanishi, K.; Kuraishi, Y.; Muraguchi, A. Protective Effect of IL-18 on Kainate-and IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2322–2328. [[CrossRef](#)]
63. Harrison, P.J.; Barton, A.J.; Najlerahim, A.; Pearson, R.C. Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuroreport* **1990**, *1*, 149–152. [[CrossRef](#)]
64. Bullock, W.M.; Cardon, K.; Bustillo, J.; Roberts, R.C.; Perrone-Bizzozero, N.I. Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients. *Am. J. Psych.* **2008**, *165*, 1594–1603. [[CrossRef](#)]
65. Korf, J.; Postema, F. Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J. Neurochem.* **1984**, *43*, 1052–1060. [[CrossRef](#)]
66. Savidge, J.R.; Bleakman, D.; Bristow, D.R. Identification of kainate receptor-mediated intracellular calcium increases in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 1763–1766. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,300

Open access books available

116,000

International authors and editors

125M

Downloads

Our authors are among the

154

Countries delivered to

TOP 1%

most cited scientists

12.2%

Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index
in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?
Contact book.department@intechopen.com

Numbers displayed above are based on latest data collected.
For more information visit www.intechopen.com



Kainate Receptors Modulating Glutamate Release in the Cerebellum

*Pilar Losada-Ruiz, Rafael Falcón-Moya
and Antonio Rodríguez-Moreno*

Abstract

Glutamate receptors of the kainate type (Kainate receptors, KARs), are mediators of ionotropic postsynaptic synaptic transmission, as well as presynaptic modulators of neurotransmitter release where they show both ionotropic and metabotropic actions regulating glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) release. The mechanisms underlying these modulatory roles are starting to be understood at some brain regions. Here we review the KARs roles and mechanisms involved in the modulation of glutamate release in the cerebellum at parallel fibers (PF)-Purkinje Cells (PuC) synapses. KARs activation mediate a biphasic effect on glutamate release at this synapse, with low kainate (KA) concentrations mediating a facilitation of glutamate release and higher KA concentrations mediating a depression of glutamate release. KA-mediated facilitation is prevented by antagonizing KARs, by inhibition of PKA or stimulation of adenylyl cyclase (AC), by blocking Ca^{2+} permeant KARs, by depleting intracellular Ca^{2+} stores and by blocking calmodulin. Thus, at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses, presynaptic KARs mediate glutamate release facilitation through Ca^{2+} -calmodulin dependent activation of adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase A signaling. KAR-mediated depression of glutamate release involves the AC/cAMP/PKA pathway as for facilitation but not Ca^{2+} -calmodulin, being in this case AC activated by a Gi/o protein to mediate a depression of glutamate release.

Keywords: cerebellum, KARs, glutamate release, presynaptic, PKA, adenylyl cyclase, Ca^{2+} calmodulin

1. Introduction

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) of mammals. Glutamate mediates its actions by activating glutamate receptors. These receptors participate in normal synaptic transmission at different synapses, in plasticity processes as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) that are considered the cellular and molecular correlation of memory and learning processes and in synaptogenesis and neuronal maturation and, additionally, failure in the functioning of this system can be the origin of some types of epilepsy and may contribute to the development of CNS disorders such as

Alzheimer's disease, Huntington's Korea, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, hypoglycemia, or cerebral ischemia [1–3].

Glutamate receptors are classically divided into two large families: ionotropic and metabotropic. Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) participate in rapid neurotransmission in the nervous system; these ionotropic receptors are classified into three types depending on the agonist that activates them with higher affinity: N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptors (NMDARs), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors (AMPA receptors), and kainate receptors (KARs). These receptors form a channel with different selectivity depending on their subunit composition, all of them being permeable to Na^+ and K^+ and, additionally, NMDARs are permeable to Ca^{2+} been some AMPARs and KARs also permeable to Ca^{2+} depending on subunit composition. They are integral membrane proteins, formed by four subunits (tetramers), being homomers or heteromers [1, 2].

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs), which participate also in neurotransmission, are coupled to G proteins and are divided into eight types (mGluR 1–8) and three groups of receptors: group I mGluRs includes mGluR1 and mGluR5 receptors. These receptors are positively coupled to phospholipase C (PLC), which facilitates the conversion of inositol diphosphate (PIP₂) to diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP₃). DAG activates protein kinase C (PKC) that phosphorylates different substrates and IP₃ causes numerous intracellular effects, including the facilitation of Ca^{2+} release from intracellular stores. Group II mGluRs includes mGluR2 and mGluR3 receptors. These receptors are negatively coupled to adenylate cyclase-mediated AMPc formation, and group III mGluRs includes mGluR4, mGluR6, mGluR7, and mGluR8 receptors. These receptors are negatively coupled to the formation of AMPc mediated by adenylate cyclase [4].

1.1 Kainate receptors

Kainate (KA) is a potent neurotoxin derived from the alga *Digenea simplex*. The word “Kainic” is derived from the Japanese “Kaininso” (“Makuri”), which means “the ghost of the sea,” and it is an agonist for both KARs and AMPARs (in the same way that the AMPARs agonist AMPA may activate KARs). Kainate is classically known for its potent epileptogenic actions [5, 6].

KA (and other agonists) activates KARs that are tetramers that resulted from different combinations of five subunits called GluK1, GluK2, GluK3, GluK4, and GluK5 (formerly known as GluR5, GluR6, GluR7 and KA1, and KA2, respectively). Of these subunits, GluK1 and GluK3 may form homomeric or heteromeric functional receptors, while GluK4 and GluK5 may only participate in functional receptors when associated with any of the GluK1, GluK2, or GluK3 subunits, but they do not combine with subunits of AMPARs [1, 7, 8].

KARs have been described in different invertebrates such as nematodes and flies [9, 10] and in different species of vertebrates such as amphibia, fish, and birds [11–13] in addition to mammals. In mammals, KARs have been observed virtually throughout the entire nervous system, although their subcellular location has not been yet fully determined. KARs are widely distributed throughout the CNS and found in the main cells and interneurons of the hippocampus, lateral amygdala, dorsal root ganglia, bipolar cells of the retina, cerebral cortex, and the cerebellum [14, 15].

The lack of knowledge about these receptors compared to other glutamatergic receptors (AMPA receptors or NMDARs) has been due to the lack of good agonist and

antagonist for receptors with particular subunit compositions and to the absence of specific antibodies for the different subunits of KARs, being therefore a significant limitation when exploring the distribution of these receptors. However, by using *in situ* hybridization techniques, it has been observed that the cells that present a significant expression of the kainate-type subunits GluK1, GluK2, GluK3, and GluK5 are distributed throughout the CNS, including nucleus striatum, hippocampus, cortex, and cerebellum [16]. Likewise, there is a high expression of the GluK4 subunit in the CA3 region of the hippocampus, as well as in the granular neurons of the dentate gyrus. The messenger of the GluK5 subunit, on the other hand, appears more abundantly and more extensively than that of the GluK4 subunit or those of the other subunits [15]. Because the *in situ* hybridization technique is informative and cannot reveal the subcellular distribution of a specific subunit, and because of pharmacological limitations, there is still much to know about the subcellular location and physiology of these receptors.

Kainate-type glutamate receptors are well established mediators of canonical, ionotropic postsynaptic synaptic transmission and, presynaptically, have a modulatory role in regulating neurotransmitter release. In the latter regard, KARs have been shown to have a noncanonical metabotropic capacity, whereby they affect the control of both glutamate and GABA release, for review see [15, 17–22]. At some excitatory glutamatergic synapses, KARs' activation can actually effect biphasic modulation, where low agonist concentrations facilitate glutamate release, while high concentrations decrease the release of the neurotransmitter, for review see [17, 18]. Mechanistic details of how this is achieved are subject of investigation and, indeed, the subcellular location of KARs responsible for presynaptic modulation remains contentious. Different roles of KARs in plasticity have also been described either in LTP or LTD, see [23] for a review of the role of KARs in plasticity.

As other glutamate receptors, KARs are directly or indirectly involved in different diseases, alterations of the nervous system and neurodegeneration and cell death processes. As previously indicated, KA is a potent neurotoxin that directly induces epilepsy and is used as a temporal lobe epilepsy model [5, 6]. Several lines of research indicate that KA directly activating KARs is involved in excitatory and inhibitory imbalances associated with epilepsy. The use of animal models for epilepsy through the use of KA injections has allowed to reproduce in great detail the symptoms observed in humans. The majority of studies of KARs' involvement in epilepsy have studied acute KA-induced seizures [24–27]. The best demonstrations of a mechanism for KARs' involvement in acute epilepsy come from studies of inhibition of GABA release by the activation of presynaptic KA receptors at interneuron-CA1 hippocampal synapses [24, 28, 29]. In chronic epilepsy, a role of KARs has been demonstrated at hippocampal mossy fibers making aberrant synapses onto granule cells of dentate gyrus expressing high number of KARs [30–32] reviewed in [6, 33]. In humans, genetic studies of members of a family affected by idiopathic juvenile absence epilepsy found elevated levels of Grik1 polymorphisms [34], and in TLE patients, GluK1 subunit containing KARs' increased levels have also been found [35]. In clinical studies, NS1209 (an AMPA/KARs' antagonist) has been found to decrease epileptic symptoms [36].

Different studies of neurotoxicity clearly indicate that KARs might be important targets for neuroprotection in neurons and glial cells. The mechanism by which KARs produce excitotoxicity and neuronal cell death is not well understood mainly because of the limitations in appropriate pharmacological tools. Toxicity of KARs involved in multiple sclerosis has also been found onto oligodendrocytes and myelin related to [37, 38], and damage has also been found at axonal levels, where AMPA/KARs' antagonists prevent it [39]. Interestingly, KARs have also been

involved in pain. They are present at dorsal roots activating nociceptors, actually there are clinical trials using KARs' antagonists to try to prevent pain showing some levels of analgesia [36]. Additionally, KARs have been involved in ischemia [40, 41], migraine pain [36], Alzheimer's disease [42], Parkinson's disease [43, 44], Huntington's Chorea [45–47], Schizophrenia [48, 49], depression [50], bipolar disorder [51, 52], mental retardation [53], and autism [54, 55] as reviewed in [56]. In general, antagonists of KARs containing particular subunits might be good targets to ameliorate symptoms or treat different CNS diseases and alterations.

2. KARs in the cerebellum

As indicated above, KARs are expressed in the cerebellar cortex [57–59]. As known, the cerebellum participates in the modulation of movement by modifying the activity patterns of motor neurons. Structurally, the cerebellum is composed of the laminar cerebellar cortex and the deep cerebellar nuclei and has five types of cells: Purkinje, stellate, basket, Golgi, and granule cells. Purkinje cells (PuC) are aligned in front of each other. Their dendritic trees form two 2-dimensional layers through which parallel fibers from the mossy fibers located in the granular layer pass. These parallel fibers (PF) establish excitatory synapses between granular cells and the spines of the PCs dendrites as well as the climbing fibers (CF, originating from the inferior olivary nucleus) with the nearby dendrites and the cellular soma. The parallel fibers pass orthogonally through the dendritic tree of the Purkinje neuron. Up to 200,000 PF form a synapse with a single PuC. Each PuC receives up to 500 synapses of CF, all originated from a single CF. Both basket cells and stellate cells provide an inhibitory (GABAergic) entry to the PuC, with cells in the basket synapse to the initial segment of the PuC axon, and stellate cells to the dendrites [60, 61].

Presynaptic KARs participate in plasticity in the cerebellum where PF synapses onto PuCs mediate a form of LTD that is affected by the paired activation of CFs [62], **Table 1**; of these two types of fibers (PF and CF synapsing onto the same cells (PC), only PF have presynaptic KARs [62], similar to other brain regions as somatosensory and visual cortices in which fibers containing and noncontaining presynaptic ionotropic glutamate receptors synapse onto the same postsynaptic cell and induce LTD [63–69]. The exact role and action mechanism of KARs mediating LTD in the cerebellum are not well known yet and await further investigation.

The proper cerebellum development depends on a precise coordinated sequence of postnatal events, some of which are mediated by glutamate receptors. For example, NMDA receptors have been implicated in the migration of granular cells [70] and in the synaptic pruning of climbing fibers [71]. Although it has recently been shown that KARs are involved in synaptic transmission, little is known about their role in development. However, the expression of kainate-type glutamate receptor subunits in immature granule cells of the outer germinal layer of the developing cerebellum suggests that KARs may also have a role in neuronal maturation. Throughout the maturation process of the cerebellum, the quantity, composition, and function of KARs vary. Initially, cerebellar granular cells have a minimal amount of AMPARs in the postnatal period compared to KARs, which are predominant in immature granule cells. Different studies have shown that KARs composed of subunits GluK1, GluK2, and GluK5 predominate, and over the period of development, an increase in the number of KARs is observed and once the adult stage is reached, the number of KARs containing GluK1 subunits suffers a reduction in their expression in the granular layer, while the GluK2 and GluK5 remain constant, in contrast to AMPARs that increase their number, constituting a very notable majority compared to KARs.

KARs' activation	High concentrations of kainate	Depression of glutamatergic synaptic transmission	Delaney and Jahr [86]
	Low concentrations of kainate	Facilitation of glutamatergic synaptic synaptic transmission	Falcón-Moya et al. [80]
	Ionic imbalance	Calcification	Korf and Postema [78]
	Increase in Ca ²⁺	Neurodegeneration	
	Nodular cerebellum lesion Putrescine increase Histological damage	Ataxia	Maiti et al. [72] de Vera et al. [73] Yamaguchi et al. [74] Andoh et al. [75]
Parallel fibers paired with postsynaptic depolarization	Presynaptic KARs' activation	Long-term depression	Crépel [62]
Increase of GluR6 and GluK2 receptors	Reduction of GABAergic activity	Schizophrenia	Harrison et al. [76] Bullock et al. [77]

Table 1.
KARs' actions in the cerebellum.

All of these findings suggest that KARs have an important role in the development process of the cerebellum. Some indications suggest that GluK1-containing KARs participate in cerebellar development in the beginning of the differentiation of granular cells.

Additionally, KARs have been involved in some brain alterations in the cerebellum and a direct relationship exists between KA injection and cerebellar ataxia. Thus, the cerebellum is an important target to study functions of KARs and its possible role causing ataxia [72–75]. Furthermore, in patients with schizophrenia, an increase in KARs containing GluR6 and K2 subunits is observed, which would mediate a reduction in GABAergic transmission [76, 77]. In neurodegeneration, KARs may have a role in calcification of the brain tissue as it has been found that local application of KA in some areas of the cerebellum produces changes in different ion levels, highly increasing Ca²⁺ levels for more than 8 weeks, which mediate calcification [78] (**Table 1**). KARs have been described as producing increases in intracellular calcium [79, 80] and seems to signal increasing intracellular calcium without putting the cell at risk due to excitotoxicity, due to its low conductance in contrast to AMPARs. Due to the lack of knowledge on the subject, further exploration is necessary to determine the KARs' role in cerebellum development and cerebellar alterations.

2.1 KARs modulating glutamate release in the cerebellum: a biphasic effect

KARs are known to be expressed in the cerebellar cortex in the axons of cerebellar granule cells that form PF and make excitatory synapses with PuC [58]. Messenger RNA transcripts encoding for different KAR subunits and functional expression of KAR subtypes have been reported [81–84]. Biophysical studies with single-channel recording have shown GluK1 activity [85], suggesting these KARs are Ca²⁺ permeable. A biphasic action of KARs, activated by the agonist domoate, has been shown previously at PF-PuC synapse, with low agonist concentrations, facilitating synaptic transmission and higher concentrations depressing synaptic

transmission [86] in agreement with what has been found in the hippocampus [87–89], cortex [90], amygdala [91], and the thalamus [92]. EPSC trial-to-trial fluctuation analysis, failure rates, as well as paired-pulse ratios have shown that these facilitatory and depressive actions of KARs in the cerebellum are mediated by presynaptic KARs [80]. However, the precise mechanism of action by which KARs mediate potentiation (and depression) of synaptic transmission at PF-PuC synapses has remained elusive until very recently [80] (**Table 1**).

2.1.1 Action mechanism for KARs-mediated facilitation of glutamate release at cerebellar PF-PuC synapses

We have recently demonstrated that the effect of the KARs' activation in this synapse requires protein kinase A (PKA) activation, since the inhibition of this protein by cAMP-Rp suppresses the effect of KA in glutamate release [80], in agreement with previous studies in hippocampus and cortex [87–89]. This congruence between mechanisms at different synapses has also been seen through the inhibition of PKA using H-89, which eliminates KARs-mediated facilitation of glutamate release. Similarly, the direct activation of AC (adenylyl cyclase) using forskolin caused an elimination of facilitation when KARs were activated by KA (with NMDARs and AMPARs blocked). These data indicate that a signaling mediated by AC/cAMP/PKA supports the facilitation of the modulation of synaptic transmission/glutamate release in these cerebellar synapses (**Figures 1–3**).

As observed in other synapses, Ca^{2+} seems to play a fundamental role in facilitating glutamate release at PF-PuC synapses. By blocking calcium-permeable KARs by the selective inhibitor philanthotoxin, KAR-mediated synaptic facilitation of glutamate release was prevented, indicating that there is a strict requirement for external Ca^{2+} entry through KARs to support the facilitation effect observed on glutamate release, indicating that KARs mediating the facilitation of glutamate release are calcium permeable [80].

Additionally, as has been reported at hippocampal synapses, the depletion of intracellular Ca^{2+} stores by a treatment with thapsigargin (a noncompetitive calcium inhibitor of the sarcoplasmic reticulum ATPase) eliminates the facilitation of glutamate release mediated by KARs' activation. The same result was found when selectively inhibiting Ca^{2+} -induced calcium release by using ryanodine, indicating that the entry of Ca^{2+} via KARs induces a mobilization of Ca^{2+} from the intraterminal Ca^{2+} reserves to mediate the increase in glutamate release observed [80].

Furthermore, it has been observed that the facilitation of glutamate release mediated by the activation of KARs is sensitive to calmodulin inhibitors. Previous studies showed that the increase of cytosolic calcium levels activates Ca^{2+} dependent on AC present in the terminals of parallel fibers. Through treatment with the calmodulin inhibitors, W-7 and calmidazolium, it has been recently shown [80] that the inhibition of calcium-calmodulin function prevents KAR-mediated presynaptic facilitation of glutamate release in cerebellar slices, supporting the hypothesis that after KAR activation and cytosolic elevation of Ca^{2+} , a calmodulin-dependent calcium coupling activates AC, which subsequently activates the AC/cAMP/PKA pathway, thus promoting synaptic facilitation through an increase in neurotransmitter release at PF-PuC synapses [80].

2.1.2 Action mechanism for KARs-mediated depression of glutamate release at cerebellar PF-PuC synapses

Recently, in the same study discussed in the previous section [80], a transient synaptic depression of glutamate release with high concentrations of KA (3 μM)

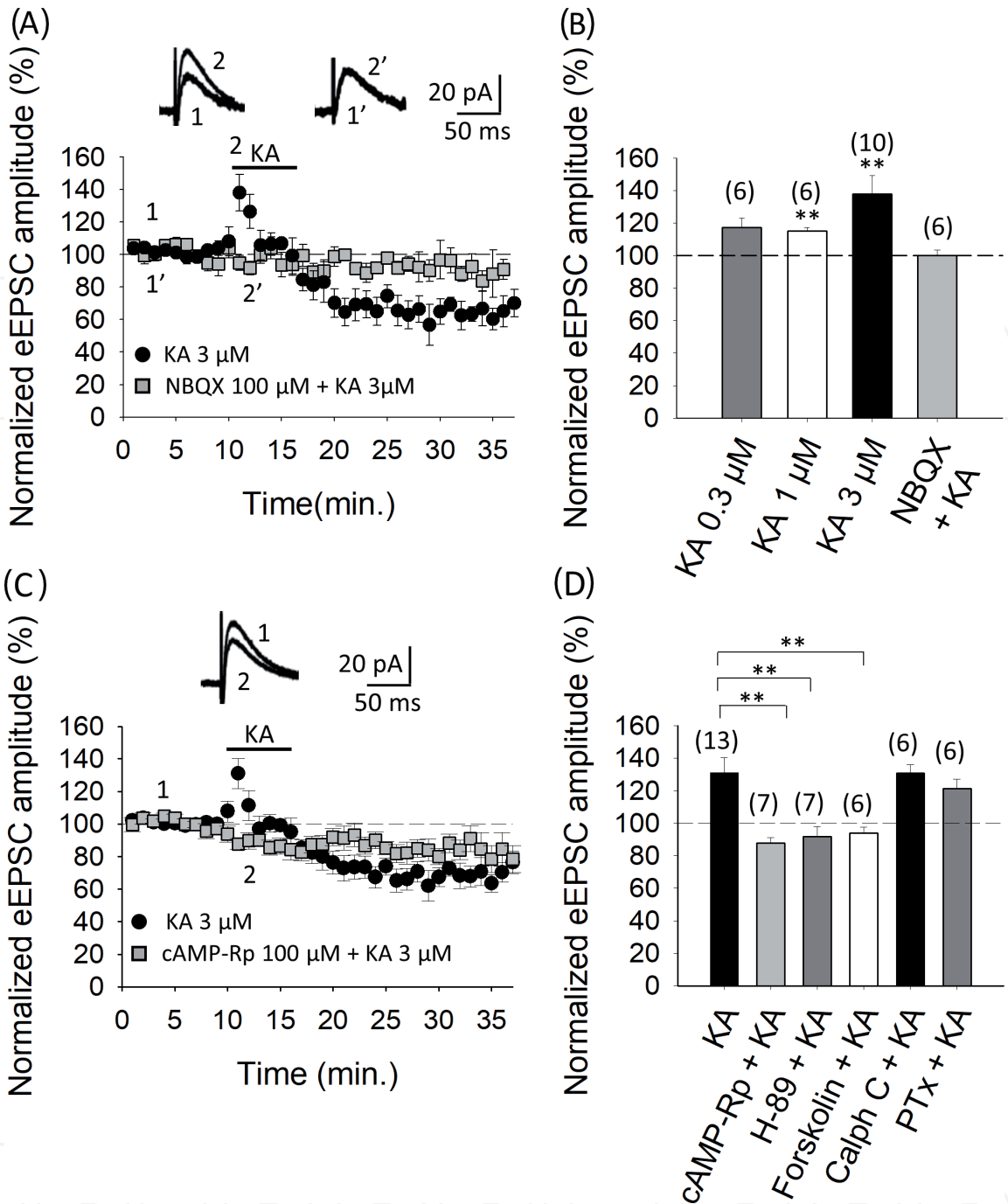


Figure 1. KAR-mediated facilitation of glutamate release involving activation of adenylyl cyclase (AC) and downstream protein kinase A (PKA) at PF-PuC synapses of the cerebellum. (A) Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in the absence (circles) and presence of NBQX (squares). Insets show traces before and after 4 min of KA perfusion in the absence (1, 2) and in the presence of 10 μM NBQX (1', 2'). (B) Quantification of modulation observed in (A) and dose-response curve. (C) Time course of the effect of KA on eEPSC amplitude in cAMP-Rp-treated slices. (D) Inhibition of PKA by cAMP-Rp (100 μM) or H-89 (2 μM), and activation of AC by forskolin (30 μM) prevented the facilitatory action of KA. Inhibition of PKC with calphostin C (1 μM) has no effect on the KA enhancement of the eEPSC amplitude. The facilitatory effect of KA is not affected in slices treated with pertussis toxin. Modified from [64].

was observed as reported for other different brain areas including thalamus, cortex, hippocampus, and amygdala [89–92]. This depression of glutamate release was prevented in the presence of cAMP-RP (which inhibits the activation of PKA), but was not affected by any other experimental modification discussed above with respect to the facilitation of glutamate release. This fact may indicate that the synaptic depression is probably related to an AC/cAMP/PKA signaling pathway (as for facilitation of glutamate release), but without the coupling of Ca^{2+} to the AC. Therefore,

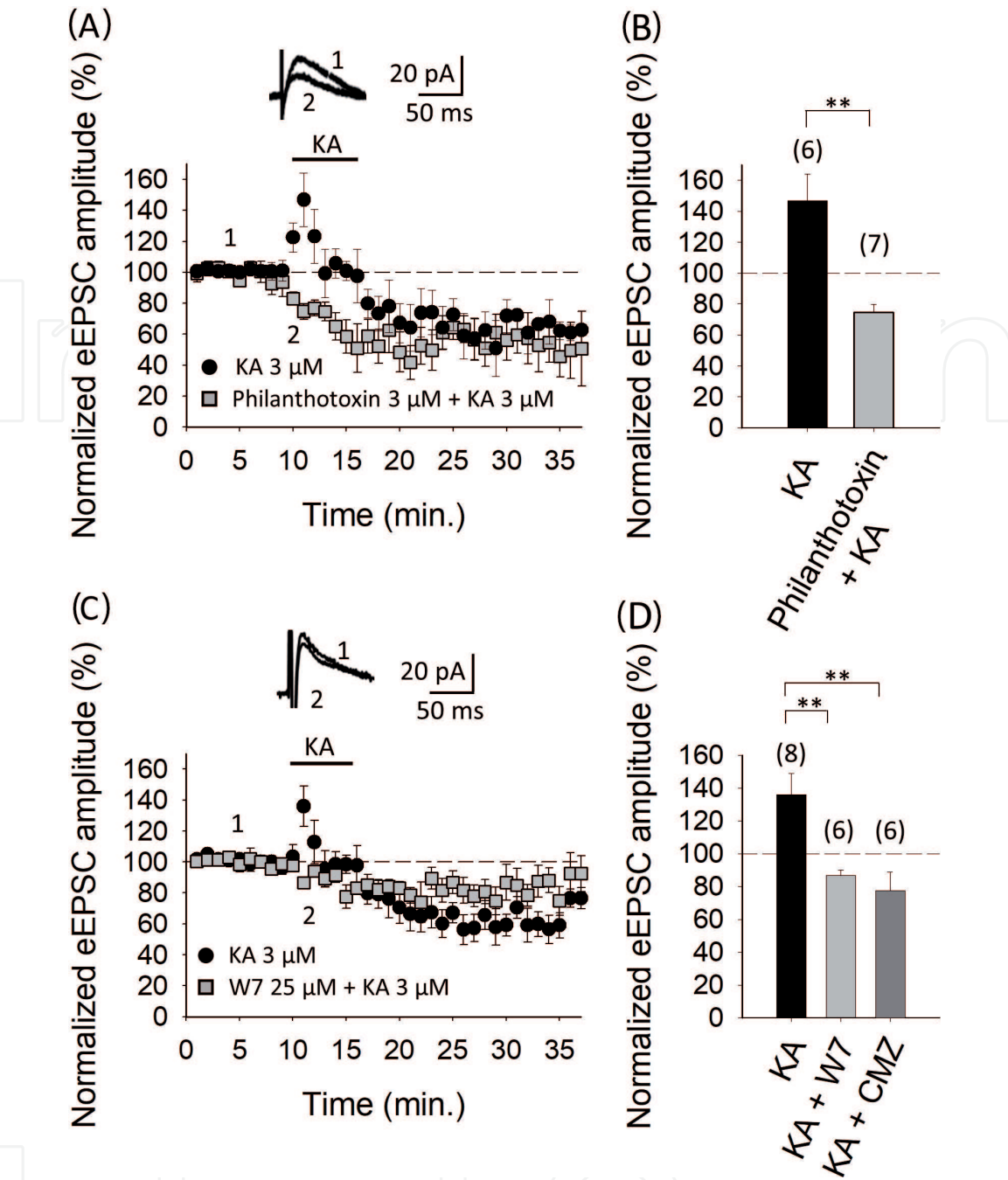


Figure 2. Facilitation of glutamate release mediated by KAR activation requires an increase of Ca^{2+} in the cytosol and Ca^{2+} calmodulin at cerebellar PF-PuC synapses. (A) Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in control condition (circles) and in slices treated with philanthotoxin (squares). (B) Quantification of modulation observed in (A). (C) Time course of KA (3 μM) effect on eEPSCs amplitude in control condition (circles) and in the slices treated with 25 μM W-7 (squares). (D) Quantification of modulation observed in (A) and in the presence of 1 μM CMZ. Modified from [64].

KA receptors have alternative mechanisms for facilitating and depressing glutamate release at PF-Pu synapses (**Figures 1–3**). In previous studies, investigating mossy fiber-CA3 hippocampal synapses [88, 89, 93, 94], as well as the amygdala [37] and cortex [36], a similar mechanism has been observed additionally involving the activation of a G-protein for the depressive effect that may well be also the case for these cerebellar synapses.

Although the presynaptic function of KARs facilitating glutamate release implies an increase in AC/cAMP/PKA signaling induced by the calcium calmodulin complex, KARs appear to be negatively associated with this pathway to carry out synaptic transmission of depression. Previous studies at hippocampal MF-CA3

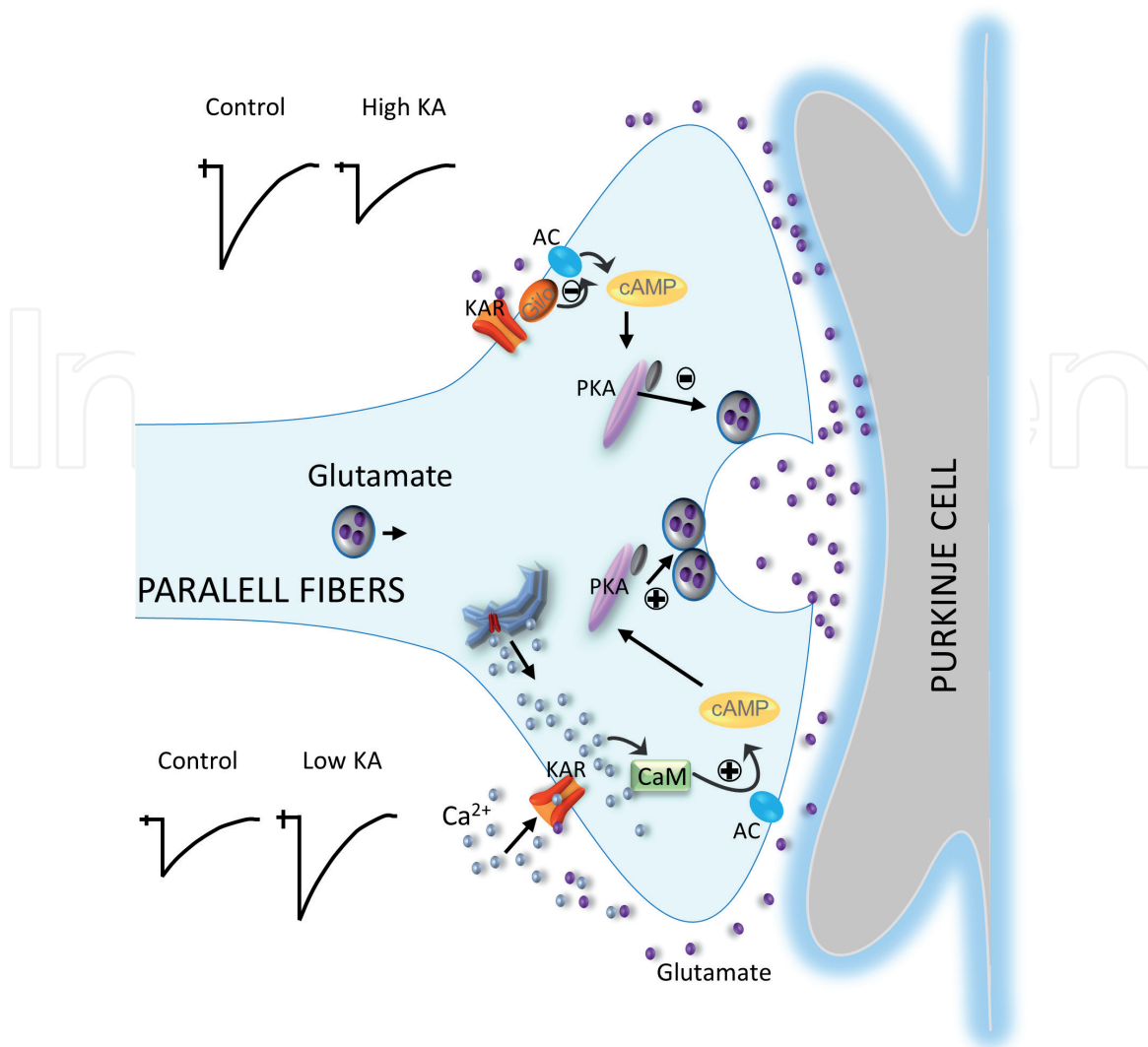


Figure 3. KAR-mediated modulation of glutamate release in the cerebellum. Actions of KARs depressing or facilitating glutamate release at the PF-PuC synapse. KAR activation by high concentrations of KA ($>3 \mu\text{M}$) depresses glutamate release at PF-PuC synapses, an effect that involves $G_{i/o}$ protein and the adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A (AC/cAMP/PKA) pathway. KAR activation by low concentrations of kainate ($<0.3 \mu\text{M}$) only facilitates glutamate release following activation of a Ca^{2+} -calmodulin/AC/cAMP/PKA pathway.

synapses and thalamocortical synapses, as well as at PF-PuC synapses, have reported that the depression of glutamate release mediated by presynaptic KARs occurs through a negative coupling to the AC/cAMP/PKA pathway, being actually evoked by the action of a PTx-sensitive protein G [80, 88, 92]. Despite the hypotheses discussed above, it is also possible that these observed mechanisms reflect the presence of two different types of KARs, a clear objective being to clarify this hypothesis in future studies.

3. Conclusions

Regarding the role and mechanisms of KARs in the modulation of glutamate release in the cerebellum, new and recent data indicate that the KARs effecting facilitation of glutamate release and synaptic transmission show a mandatory dependence on adenylyl cyclase (AC) and cAMP-mediated protein kinase A (PKA) activity. Furthermore, the KAR-mediated facilitation of transmission is contingent on both external Ca^{2+} permeation into the cytosol through KAR and repletion of

intracellular Ca^{2+} stores. Finally, a major sensitivity of facilitation to calmodulin inhibition suggests that KARs are coupled through a Ca^{2+} -calmodulin/AC/cAMP/PKA pathway at PF-PuC synapses in the cerebellum. KARs seem to use the inhibition of the AC/cAMP/PKA pathway to mediate a depression of glutamate release at the same synapses, but the activation of the AC does not involve calcium calmodulin and seems to be directly activated by a PTX-sensitive G protein.

Acknowledgements

Work related to kainate receptors in the corresponding author AR-M's laboratory has been supported by Spanish Ministry of Education and Fundación Rodríguez-Pascual grants.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author details

Pilar Losada-Ruiz, Rafael Falcón-Moya and Antonio Rodríguez-Moreno*
Department of Physiology, Anatomy and Cell Biology, Pablo de Olavide University, Seville, Spain

*Address all correspondence to: arodmor@upo.es

IntechOpen

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

References

- [1] Lerma J, Paternain A, Rodríguez-Moreno A, López-García JC. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiological Reviews*. 2001;**81**:971-998. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.3.971
- [2] Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*. 2010;**62**: 405-496. DOI: 10.1124/pr.109.002451
- [3] Flores G, Negrete-Díaz JV, Carrión M, Andrade-Talavera Y, Bello SA, Sihra TS, et al. Excitatory amino acids in neurological and neurodegenerative disorders. In: *Amino Acids in Human Nutrition and Health*. Wallingford: CAB International; 2011. pp. 427-453
- [4] Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2010;**50**:295-322. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- [5] Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 1978;**271**:676-677. DOI: 10.1038/271676a0
- [6] Falcón-Moya R, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Kainate receptors: Role in epilepsy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;**11**:217. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00217
- [7] Lerma J, Marques JM. Kainate receptors in health and disease. *Neuron*. 2013;**80**(2):292-311. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.09.045
- [8] Paternain AV, Rodríguez-Moreno A, Villarroel A, Lerma J. Activation and desensitization properties of native and recombinant kainate receptors. *Neuropharmacology*. 1998;**37**(10-11):1249-1259
- [9] Lee DL, editor. *The Biology of the Nematodes*. Boca Raton: CRC Press. Taylor and Francis Group; 2010
- [10] Li Y, Dharkar P, Han TH, Serpe M, Lee CH, Mayer ML. Novel functional properties of *Drosophila* CNS glutamate receptors. *Neuron*. 2016;**92**(5):1036-1048
- [11] Somogyi P, Eshhar N, Teichberg VI, Roberts JDB. Subcellular localization of a putative kainate receptor in Bergmann glial cells using a monoclonal antibody in the chick and fish cerebellar cortex. *Neuroscience*. 1990;**35**(1):9-30
- [12] Atoji Y, Sarkar S. Localization of AMPA, kainate, and NMDA receptor mRNAs in the pigeon cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2019;**98**:71-79
- [13] Estabel J, König N, Exbrayat JM. AMPA/kainate receptors permeable to divalent cations in amphibian central nervous system. *Life Sciences*. 1999;**64**(8):607-616
- [14] Huettner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology*. 2003;**70**(5):387-407. DOI: 10.1016/S0301-0082(03)00122-9
- [15] Jane DE, Lodge D, Collingridge GL. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 2009;**56**(1):90-113. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.08.023
- [16] Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J. GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *Journal of Neuroscience*. 2000;**20**(1):196-205. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-01-00196.2000
- [17] Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *Journal of*

- Neurochemistry. 2007;**103**(6):2121-2135. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04924.x
- [18] Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Kainate receptors with a metabotropic *modus operandi*. Trends in Neurosciences. 2007;**30**(12):630-637. DOI: 10.1016/j.tins.2007.10.001
- [19] Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. In: Kainate Receptors. Boston, MA: Springer; 2011. pp. 1-10
- [20] Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. In: Kainate Receptors. Boston, MA: Springer; 2011. pp. 39-48
- [21] Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: Mechanisms. Neurochemistry International. 2013;**62**(7):982-987. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.03.012
- [22] Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A. Non-canonical mechanisms of presynaptic kainate receptors controlling glutamate release. Frontiers in Molecular Neuroscience. 2018;**11**:128. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00128
- [23] Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A. Kainate receptors: Multiple roles in neuronal plasticity. The Neuroscientist. 2014;**20**(1):29-43. DOI: 10.1177/1073858413478196
- [24] Rodríguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. Neuron. 1997;**19**(4):893-901. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80970-8
- [25] Mulle C, Sailer A, Pérez-Otaño I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, et al. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainite-induced seizures in GluR6-deficient mice. Nature. 1998;**392**:601-605
- [26] Smolders I, Bortolotto ZA, Clarke VR, Warre R, Khan GM, O'Neill MJ, et al. Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. Nature Neuroscience. 2002;**5**(8):796-804
- [27] Fritsch B, Reis J, Gasior M, Kaminski RM, Rogawski MA. Role of GluK1 kainate receptors in seizures, epileptic discharges, and epileptogenesis. The Journal of Neuroscience. 2014;**34**(17):5765-5775. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5307-13.2014
- [28] Rodríguez-Moreno A, Lerma J. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. Neuron. 1998;**20**(6):1211-1218. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80501-2
- [29] Rodríguez-Moreno A, López-García JC, Lerma J. Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;**97**(3):1293-1298. DOI: 10.1073/pnas.97.3.1293
- [30] Artinian J, Peret A, Marti G, Epsztein J, Crépel V. Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. The Journal of Neuroscience. 2011;**31**(30):10811-10818. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0388-11.2011
- [31] Artinian J, Peret A, Mircheva Y, Marti G, Crépel V. Impaired neuronal operation through aberrant intrinsic plasticity in epilepsy. Annals of Neurology. 2015;**77**(4):592-606. DOI: 10.1002/ana.24348

- [32] Peret A, Christie LA, Ouedraogo DW, Gorlewicz A, Epsztein J, Mulle C, et al. Contribution of aberrant GluK2-containing kainate receptors to chronic seizures in temporal lobe epilepsy. *Cell Reports*. 2014;**8**(2):347-354. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.032
- [33] Crépel V, Mulle C. Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. *Current Opinion in Pharmacology*. 2015;**20**:83-88. DOI: 10.1016/j.coph.2014.11.012
- [34] Sander T, Hildmann T, Kretz R, Fürst R, Sailer U, Bauer G, et al. Allelic association of juvenile absence epilepsy with a GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) polymorphism. *American Journal of Medical Genetics*. 1997;**74**:416-421
- [35] Li JM, Zeng YJ, Peng F, Li L, Yang TH, Hong Z, et al. Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions. *Brain Research*. 2010;**1311**:166-174
- [36] Swanson GT. Targeting AMPA and kainate receptors in neurological disease: Therapies on the horizon? *Neuropsychopharmacology*. 2009;**34**:249-250
- [37] Sanchez-Gomez MV, Matute C. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiology of Disease*. 1999;**6**:475-485. DOI: 10.1006/nbdi.1999.0264
- [38] Matute C. Characteristics of acute and chronic kainate excitotoxic damage to the optic nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;**95**:10229-10234. DOI: 10.1073/pnas.95.17.10229
- [39] Tekkok SB, Goldberg MP. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *The Journal of Neuroscience*. 2001;**21**:4237-4248. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-12-04237.2001
- [40] Xu J, Liu Y, Zhang GY. Neuroprotection of GluR5-containing kainate receptor activation against ischemic brain injury through decreasing tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors mediated by SRC kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;**283**:29355-29366
- [41] O'Neill MJ, Bogaert L, Hicks CA, Bond A, Ward MA, Ebinger G, et al. LY377770, a novel iGlu5 kainate receptor antagonist with neuroprotective effects in global and focal cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*. 2000;**39**:1575-1588. DOI: 10.1016/S0028-3908(99)00250-6
- [42] Aronica E, Dickson DW, Kress Y, Morrison JH, Zukin RS. Non-plaque dystrophic dendrites in Alzheimer hippocampus: A new pathological structure revealed by glutamate receptor immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1998;**82**:979-991. DOI: 10.1016/S0306-4522(97)00260-1
- [43] Luquin MR, Saldise L, Guillén J, et al. Does increased excitatory drive from the subthalamic nucleus contribute to dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease? *Experimental Neurology*. 2006;**201**:407-415
- [44] Carson KM, Andresen JM, Orr HT. Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2009;**19**:247-253
- [45] Wagster MV, Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA. Selective loss of [3H] kainic acid and [3H] AMPA binding in layer VI of frontal cortex in Huntington's disease. *Experimental Neurology*. 1994;**127**:70-75. DOI: 10.1006/exnr.1994.1081
- [46] Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E, et al.

Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;**94**:3872-3876. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3872

[47] MacDonald ME, Vonsattel JP, Shrinidhi J, Couropmitree NN, Cupples LA, Bird ED, et al. Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology*. 1999;**53**:1330-1332. DOI: 10.1212/WNL.53.6.1330

[48] Garey LJ, Von Busmann KA, Hirsch SR. Decreased numerical density of kainate receptor-positive neurons in the orbitofrontal cortex of chronic schizophrenics. *Experimental Brain Research*. 2006;**173**:234-242. DOI: 10.1007/s00221-006-0396-8

[49] Begni S, Popoli M, Moraschi S, Bignotti S, Tura GB, Gennarelli M. Association between the ionotropic glutamate receptor kainate 3 (GRIK3) ser310ala polymorphism and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2002;**7**:416-418. DOI: 10.1038/sj.mp.4000987

[50] Schiffer HH, Heinemann SF. Association of the human kainate receptor GluR7 gene (GRIK3) with recurrent major depressive disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*. 2007;**144**:20-26. DOI: 10.1002/ajmg.b.30374

[51] Pickard BS, Malloy MP, Christoforou A, et al. Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*. 2006;**11**:847-857. DOI: 10.1038/sj.mp.4001867

[52] Wilson GM, Flibotte S, Chopra V, Melnyk BL, Honer WG, Holt RA. DNA copy number analysis in

bipolar disorder and schizophrenia reveals aberrations in genes involved in glutamate signaling. *Human Molecular Genetics*. 2006;**15**:743-749. DOI: 10.1093/hmg/ddi489

[53] Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, et al. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *American Journal of Human Genetics*. 2007;**81**:792-798. DOI: 10.1086/521275

[54] Jamain S, Betancur C, Mol Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, et al. Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Molecular Psychiatry*. 2002;**7**:302-310. DOI: 10.1038/sj.mp.4000979

[55] Bowie D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 2008;**7**:129-143

[56] Matute C. Therapeutic potential of kainate receptors. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2011;**17**(6):661-669. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00204.x

[57] Pemberton KE, Belcher SM, Ripellino JA, Howe JR. High-affinity kainate-type ion channels in rat cerebellar granule cells. *The Journal of Physiology*. 1998;**510**(2):401-420. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.401bk.x

[58] Smith TC, Wang LY, Howe JR. Distinct kainate receptor phenotypes in immature and mature mouse cerebellar granule cells. *The Journal of Physiology*. 1999;**517**(1):51-58. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.0051z.x

[59] Spiliopoulos K, Fragioudaki K, Giompres P, Kouvelas E, Mitsacos A. Expression of GluR6 kainate receptor subunit in granular layer of weaver mouse cerebellum. *Journal of Neural Transmission*. 2009;**116**(4):417-422. DOI: 10.1007/s00702-009-0199-8

- [60] Tyrrell T, Willshaw D. Cerebellar cortex: Its simulation and the relevance of Marr's theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 1992;**336**(1277):239-257. DOI: 10.1098/rstb.1992.0059
- [61] Wadiche JI, Jahr CE. Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron*. 2001;**32**(2):301-313. DOI: 10.1016/S0896-6273(01)00488-3
- [62] Crépel F. Role of presynaptic kainate receptors at parallel-fiber-purkinje cell synapses in induction of cerebellar LTD: Interplay with climbing fiber input. *Journal of Neurophysiology*. 2009;**102**:965-973
- [63] Rodríguez-Moreno A, Paulsen O. Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nature Neuroscience*. 2008;**11**:744-745
- [64] Banerjee A, Meredith RM, Rodríguez-Moreno A, Mierau SB, Auberson YP, Paulsen O. Double dissociation of spike timing-dependent potentiation and depression by subunit-preferring NMDA receptors antagonists in mouse barrel cortex. *Cerebral Cortex*. 2009;**19**:2959-2969
- [65] Rodríguez-Moreno A, Banerjee A, Paulsen O. Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent depression at cortical synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2010;**2**:18. DOI: 10.3389/fnsyn.2010.00018
- [66] Rodríguez-Moreno A, Kohl MM, Reeve J, Eaton TR, Collins HA, Anderson HL, et al. Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment specific photorelease of a use-dependent NMDA antagonist. *The Journal of Neuroscience*. 2011;**31**:8564-8569
- [67] Buchanan KA, Blackman AV, Moreau AW, Elgar D, Costa RP, Lalanne T, et al. Target-specific expression of presynaptic NMDA receptors in neocortical microcircuits. *Neuron*. 2012;**75**:451-466
- [68] Rodríguez-Moreno A, González-Rueda A, Banerjee A, Upton ML, Craig M, Paulsen O. Presynaptic self-depression at developing neocortical synapses. *Neuron*. 2013;**77**:35-42
- [69] Banerjee A, González-Rueda A, Sampaio-Baptista C, Paulsen O, Rodríguez-Moreno A. Distinct mechanisms of spike timing-dependent LTD at vertical and horizontal inputs onto L2/3 pyramidal neurons in mouse barrel cortex. *Physiological Reports*. 2014;**2**(3):1-11. DOI: 10.1002/phy2.271
- [70] Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*. 1993;**260**(5104):95-97. DOI: 10.1126/science.8096653
- [71] Rabacchi S, Bailly Y, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*. 1992;**256**(5065):1823-1825. DOI: 10.1126/science.1352066
- [72] Maiti A, Salles KS, Grassi S, Abood LG. Behavior and receptor changes after kainate lesioning of nodular cerebellum. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1986;**25**(3):589-594. DOI: 10.1016/0091-3057(86)90146-2
- [73] de Vera N, Camón L, Martínez E. Cerebral distribution of polyamines in kainic acid-induced models of status epilepticus and ataxia in rats. Overproduction of putrescine and histological damage. *European Neuropsychopharmacology*. 2002;**12**(5):397-405. DOI: 10.1016/S0924-977X(02)00050-0
- [74] Yamaguchi T, Hayashi K, Murakami H, Maruyama S, Yamaguchi M. Distribution and characterization of

the glutamate receptors in the CNS of ataxic mutant mouse. *Neurochemical Research*. 1984;**9**(4):497-505. DOI: 10.1007/BF00964376

[75] Andoh T, Kishi H, Motoki K, Nakanishi K, Kuraishi Y, Muraguchi A. Protective effect of IL-18 on kainate- and IL-1 β -induced cerebellar ataxia in mice. *Journal of Immunology*. 2008;**180**:2322-2328. DOI: 10.4049/jimmunol.180.4.2322

[76] Harrison PJ, Barton AJ, Najlerahim A, Pearson RC. Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuroreport*. 1990;**1**(2):149-152

[77] Bullock WM, Cardon K, Bustillo J, Roberts RC, Perrone-Bizzozero NI. Altered expression of genes involved in GABAergic transmission and neuromodulation of granule cell activity in the cerebellum of schizophrenia patients. *American Journal of Psychiatry*. 2008;**165**(12):1594-1603. DOI: 10.1176/appi.ajp.2008.07121845

[78] Korf J, Postema F. Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *Journal of Neurochemistry*. 1984;**43**(4):1052-1060. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb12843.x

[79] Savidge JR, Bleakman D, Bristow DR. Identification of kainate receptor-mediated intracellular calcium increases in cultured rat cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*. 1997;**69**(4):1763-1766. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69041763.x

[80] Falcón-Moya R, Losada-Ruiz P, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Cerebellar Kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release requires Ca^{2+} -calmodulin and PKA. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;**11**:1-10. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00195

[81] Bahn S, Volk B, Wisden W. Kainate receptor gene expression

in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience*. 1994;**14**(9):5525-5547. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.14-09-05525.1994

[82] Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, et al. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: Expression in the nervous system during development. *Neuron*. 1990;**5**(5):583-595. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90213-y

[83] Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*. 1992;**8**(4):775-785. DOI: 10.1016/0896-6273(92)90098-x

[84] Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *Journal of Comparative Neurology*. 1994;**349**(1):85-110. DOI: 10.1002/cne.903490107

[85] Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG. Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *Journal of Physiology*. 1996;**492**:129-142

[86] Delaney AJ, Jahr CE. Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron*. 2002;**36**(3):475-482. DOI: 10.1016/s08966273(02)01008-5

[87] Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*. 2004;**557**(3):733-745. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.065029

- [88] Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Delgado-García JM, Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. *Journal of Neurophysiology*. 2006;**96**(4):1829-1837. DOI: 10.1152/jn.00280.2006
- [89] Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *Journal of Neurochemistry*. 2012;**122**(5):891-899. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x
- [90] Rodríguez-Moreno A, Sihra TS. Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca^{2+} -calmodulin and PKA in cerebrocortical synaptosomes. *FEBS Letters*. 2013;**587**(6):788-792. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.071
- [91] Negrete-Díaz JV, Duque-Feria P, Andrade-Talavera Y, Carrión M, Flores G, Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated depression of glutamatergic transmission involving protein kinase A in the lateral amygdala. *Journal of Neurochemistry*. 2012;**121**(1):36-43. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07665.x
- [92] Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Pre-synaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca^{2+} -calmodulin at thalamocortical synapses. *Journal of Neurochemistry*. 2013;**126**(5):565-578. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.071
- [93] Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Delgado-García JM, Rodríguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition converges with presynaptic inhibition mediated by Group II mGluRs and long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Journal of Neural Transmission*. 2007;**114**(11):1425-1431. DOI: 10.1007/s00702-007-0750-4
- [94] Lyon L, Borel M, Carrión M, Kew JN, Corti C, Harrison PJ, et al. Hippocampal mossy fiber long-term depression in Grm2/3 double knockout mice. *Synapse*. 2011;**65**(9):945-954. DOI: 10.1002/syn.20923